

J Liedl

Mainx 1902

Digitized by the Internet Archive
in 2026

Aus dem Anatomischen Institut der
Johannes Gutenberg-Universität in Mainz

DER HYALINE KNORPEL IM EXPERIMENT

(Histochemische Untersuchungen am Kniegelenkknorpel
von Meerschweinchen nach dosiertem Lauftraining)

Inauguraldissertation
zur Erlangung der Würde des Doktors der Zahnmedizin
der Johannes Gutenberg-Universität in Mainz

dem Fachbereich Medizin vorgelegt von

Josef L i e d l

aus Prag

Mainz 1982



Inhaltsverzeichnis

	Seite
1. EINLEITUNG	1
2. MATERIAL UND METHODE	6
a) Material	6
b) Methode	8
1. Glykogenfärbung nach Best	8
2. PAS-Reaktion auf neutrale Mucopolysaccharide der Knorpelgrundsubstanz	9
3. Alcianblau-PAS Färbung (saure Mucopolysaccharide)	9
4. Toluidinblaufärbung auf Metachromasie der Knorpelgrundsubstanz	9
3. BEFUNDE UND ERGEBNISSE	10
3.1. Glykogenlokalisation	10
3.1.1. Kontrolltiere (Gruppe A)	10
3.1.2. Gruppe B - Tiere mit 3.200 m Laufstrecke	12
3.1.3. Gruppe C - Tiere mit 8.600 m Laufstrecke	12
3.1.4. Gruppe D - Tiere mit 11.400 m Laufstrecke in etwa 6 Wochen	13
3.2. PAS-Reaktion	14
3.2.1. Kontrolltiere Gruppe A	14
3.2.2. Gruppe B - Tiere mit 3.200 m Laufstrecke	15
3.2.3. Gruppe C - Tiere mit 8.600 m Laufstrecke	15
3.2.4. Gruppe D - Tiere mit 11.400 m Laufstrecke	16
3.3. Alcianblue-PAS-Reaktion	16
3.3.1. Kontrolltiere Gruppe A - Tiere ohne Laufbelastung	16
3.3.2. Gruppe B - Tiere mit 3.200 m Laufstrecke	18
3.3.3. Gruppe C - Tiere mit 8.600 m Laufstrecke	19
3.3.4. Gruppe D - Tiere mit 11.400 m Laufstrecke	20
3.4. Toluidinblau-Reaktion	21
3.4.1. Kontrolltiere Gruppe A	21
3.4.2. Gruppe B - Tiere mit 3.200 m Laufstrecke	22
3.4.3. Gruppe C - Tiere mit 8.600 m Laufstrecke	22
3.4.4. Gruppe D - Tiere mit 11.400 m Laufstrecke	22
4. DISKUSSION	23
5. ZUSAMMENFASSUNG	35
6. LITERATURVERZEICHNIS	36
Lebenslauf	

1. Einleitung

Die Morphologie, chemische Zusammensetzung und der Stoffwechsel des hyalinen Knorpels wurden bisher in der Literatur eingehend beschrieben. Erwähnt seien hier die Arbeiten von Rössler (1961), Campo und Tourtellotte (1967), Mankin (1967), Levai und Marx (1968), Vinel (1970), Vignon (1971), Maroudas (1972), Krakovits (1972), Peyron (1973), Ogden (1974), McLeod et al. (1977), Finlay (1977) u.a.

Histologisch läßt der Gelenkknorpel eine oberflächliche Tangentialschicht, eine Übergangszone, eine Radiärfaserzone und eine Verkalkungszone, an die sich der subchondrale Knochen anschließt, erkennen.

Der hyaline Knorpel besteht aus Zellen und einer Interzellularsubstanz, die sich wiederum aus geformten Anteilen - kollagenen Fasern - und ungeformten Anteilen - der Grundsubstanz - zusammensetzt. Die kollagenen Fibrillen sind an der Gelenkoberfläche tangential ausgerichtet (Tangentialfaserschicht) und biegen in der Übergangszone arkadenförmig in die Tiefe des Knorpels um. In der III. Knorpelzone (nach Benninghoff, 1924) sind die Fasern radiär angeordnet, haben einen größeren Durchmesser und ziehen zwischen den Chondronen, die sie schalenartig umfassen und die bei Belastung als Puffer wirken, zur Verkalkungsschicht. Eine Stoßdämpferfunktion schreibt Rössler (1961) auch der Grundsubstanz zu. Das Zusammenspiel zwischen der Faserstruktur und der Interzellularsubstanz stellt die Grundlage der Elastizität und der Härte der Knorpelschicht dar. Mit abnehmendem Flüssigkeitsgehalt wächst die Härte, und die Elastizität wird kleiner. Der Flüssigkeits- bzw. Wassergehalt der Knorpelgrundsubstanz ist wiederum von dem Wasserbindungs (quellungs-) vermögen ihrer chemischen Bestandteile abhängig. Die sauren Mucopolysaccharide sind für das Wasserbindungsvermögen verantwortlich zu machen.

Der Baustein eines sauren Mucopolysaccharids ist ein Polymer aus einem Disaccharid mit einem Aminosucker (Hexosamin), Uronsäure und ggf. auch Estersulfatgruppen. Die sauren Mucopolysaccharide unterscheiden sich nur durch ihre Monosaccharidkomponente bzw. durch ihren Sulfatgehalt und den Typ der glykosidischen Bindung der Monosaccharidreste. Wegen ihres Polysaccharidcharakters und des regelmäßigen Aufbaus aus Aminosuckern haben sie den systematischen Namen Glykosaminoglykane erhalten (Buddecke, 1973).

Der Aufbau dieser Substanz in vivo geschieht nach bisher vorliegenden biochemischen, histochemischen und autoradiographischen Untersuchungen offenbar so, daß Sulfatgruppen in ein zunächst neutrales Polysaccharid eingebaut werden, so daß man von einer "chemischen Reifung" im Verlauf der Ontogenese sprechen kann. Erst das voll sulfatierte Endprodukt ist funktionsfähig (Dietel, 1976). Der Mucopolysaccharidgehalt und die qualitative Zusammensetzung der Mucopolysaccharide im hyalinen Knorpel variieren mit dem Alter (Lash und Whitehouse, 1960) und mit der topographischen Lage im Knorpel (Lempert et al., 1974).

Das wichtigste saure Mucopolysaccharid ist die Chondroitinschwefelsäure A, die 20% der Trockensubstanz ausmacht (Miyazaki, 1934a; Eichelberger et al., 1951; Loeven, 1955; Knese und Knoop, 1961a). Bis zu 40% Chondroitinschwefelsäure fand Winter (1932) und Leppelmann (1959) 37,6% im Knorpel des Neugeborenen.

Mit der Abnahme des Mucopolysaccharidgehaltes im zunehmenden Alter befaßten sich Sylven (1947a), Loewi (1953) und Graumann (1964). Leppelmann (1959) stellte bei 90jährigen Patienten einen Chondroitinsulfatgehalt von 9,6% der Trockensubstanz fest, bei Neugeborenen fand er noch 37,6%. Gleichzeitig mit der Abnahme der Mucopolysaccharide kommt es mikroskopisch zu einem Sichtbarwerden ("Demaskierung") der kollagenen Fasern. Der Abfall der sauren Mucopolysaccharide ist nicht nur quantitativ erfaßbar, sondern auch qualitativ zu differenzieren; es kommt mit steigendem Alter zur relativen Vermehrung der Chondroitinschwefelsäure C gegenüber Chondroitinschwefelsäure A. Keratansulfat nimmt bei älteren Individuen ebenfalls an Menge zu (Fawns et al., 1953; Shetlar et al., 1955; Kuhn et al., 1958; Hallen, 1958; Kaplan et al., 1959; Maibach, 1963; Földes et al., 1963; Svejcar, 1968; Lothe und Rüttner, 1971; Kostenszky und Olah, 1972; Musilová und Musil, 1973; Knese, 1979).

Die Bildner der Knorpelgrundsubstanz sind die Zellen. Sie sind gleichzeitig Orte des Kohlenhydrat - Eiweiß - und Lipidstoffwechsels. Die Zellen sind von einer schmalen Knorpelkapsel umgeben, die besonders viel Chondroitinsulfat enthält. Sie beinhalten Wasser, Fett und Glykogen (Watzka, 1964). Chondroitinsulfat ist auch die Ursache der Maskierung der kollagenen Fibrillen und der starken Basophilie der Grundsubstanz. Die Basophilie ist in der Nähe der Zellnester stärker ausgebildet als zwischen den Chondronen (Interterritorialsubstanz).

Die Synthese der Grundsubstanz beginnt intrazellulär, der Abbau extrazellulär. Eingeleitet wird der Abbauprozess durch eine extrazelluläre proteolytische Spaltung und wird mit großer Wahrscheinlichkeit nach Pinozytose der Bruchstücke in den Chondrozyten zu Ende geführt (Morrison, 1970; Rüttner et al., 1974). Die Mitwirkung von Zellen bei der Mineralisation ist noch ungeklärt. In den Chondrozyten wurden verschiedene Substanzen nachgewiesen. So berichten Bona et al. (1964) nach histochemischen und enzymologischen Untersuchungen des Wachstumsknorpels bei 15 Tage alten Albinoratten und Bona et al. (1965a) an zwei menschlichen Wachstumsknorpelbiopsien über DNS, RNS und Proteine innerhalb der Zellkerne, sowie RNS, Proteine, Glykogen und saure Mucopolysaccharide innerhalb des Zytoplasmas. In allen Zellen haben sie eine hochgradige Enzymtätigkeit festgestellt. Die Zellen sollen außerdem auch einzelne Lipidtropfen enthalten (Anderson, 1964; Collins et al., 1965). Die Lipidspeicherung ist nach Bell (1909) und Carlson (1957) nicht als ein Zeichen der Degeneration anzusehen, sondern als Ausdruck metabolischer Leistung. Rohr und Walter (1966) erwähnen einen direkten Zusammenhang zwischen Glykogenaufnahme und Produktion von Grundsubstanz (Kellewald, Diss. 1972).

Das morphologische Bild des Chondrozyten ist mannigfaltig. Fixierung und Färbungen beeinflussen Größe und Form. Von einer starken Schrumpfung der Knorpelzellen durch Formalinfixierung berichtet Zbinden (1953a,b). Jeder Kontakt mit Wasser zieht nach Durning (1958) eine Schrumpfung der Knorpelzelle nach sich, was auf ihren relativ hohen Wassergehalt zurückzuführen ist. Auch Entkalkungsmitteln gegenüber (Salpetersäure, Salzsäure) erweist sich das Knorpelglykogen als besonders resistent (Schajowicz und Cabrini, 1955).

Die Gestalt und Struktur der Epiphysenknorpelzellen ist von ihrer Lage abhängig. Die Umgestaltung von der schlanken Appositionszelle zu der elliptoiden oder rundlichen hyalinen Knorpelzelle führt zu einer Vergrößerung des Zelleibs. Die Glykogenspeicherung in der Knorpelzelle steht mit der Synthese von Bindegewebspolysacchariden in Zusammenhang. Die regionale Verteilung der entsprechenden Enzyme in der Epiphyse läßt annehmen, daß die Proteoglykansynthese der Glykogensynthese folgt (Knese, 1979).

Glykogen ist ein ausschließlich aus Glucose aufgebautes Polysaccharid (Homoglykan) mit stark verzweigter Baumstruktur und einem Molekulargewicht zwischen 1 und 100 Mio. Da Glykogen als Makromolekül osmotisch

nahezu inaktiv ist, stellt es eine besonders vorteilhafte Speicherform für Glucose dar. In der lebenden Zelle ist das Glykogen entweder in Form submikroskopisch kleiner Teilchen diffus im Cytoplasma verteilt (Couteaux-Bargeton, 1950) oder auch bei optimaler Fixierung als partikuläres Glykogen vorhanden (Gendre, 1938). Meistens handelt es sich um perinucleär gelegene Granula, die in Form von Schollen, Tropfen, Körnern oder als feingranuläres Glykogen erscheinen. Auch im gefrieretrockneten Material liegt das Knorpelglykogen zwar gleichmäßig verteilt, aber in feingranulierter Form vor (Mancini, 1948; Akamine et al., 1954). Diese perinucleäre Lage der Glykogenmenge deutet darauf hin, daß das Polysaccharid unter dem Einfluß des Zellkerns gebildet wird (Gendre, 1938). Graumann (1964) erwähnt im Cytoplasma von Chondrozyten dichtgedrängten Glykogengranula. In der Interzellulärsubstanz des Knorpels wurde dagegen Glykogen nicht nachgewiesen.

In der Literatur konnten wir keine Angaben darüber finden, wie sich Glykogenmenge und ihre zonale Verteilung im Knorpel nach muskulärer Belastung ändern. Es sollte daher in dieser Arbeit geklärt werden, wie Chondrozyten des hyalinen Knorpels nach dosiertem Lauftraining reagieren, insbesondere in bezug auf ihre Glykogenspeicherfähigkeit.

Jede Belastungszu- oder abnahme führt zu einer Veränderung der Stoffwechselleistung der Chondrozyten. Zahlreiche Untersuchungen der chemischen Zusammensetzung der Interzellulärsubstanz nach Immobilisation liegen bereits vor (Matthias und Glupe, 1966; Walcher und Stürz, 1971; Evans et al., 1960; Thaxter et al., 1965). Reaktionen des Gelenkknorpels auf experimentell verursachte Läsionen wurden von Puhl und Dustmann (1978) beschrieben. Eine Verminderung der Anfärbbarkeit, d.h. Verlust an sauren Mucopolysacchariden, fand Troyer (1975) bereits in den ersten Tagen nach Immobilisation, ebenso eine Reduzierung des Glycosaminoglycangehaltes und eine Ausbildung von sog. Clustern (= dichtliegende Knorpelzellhaufen). Dustmann et al. (1971) sahen Oberflächenveränderungen des Knorpels nach Immobilisation. Neben Defekten an der Knorpeloberfläche beschreibt z.B. Trias (1961) eine Verdünnung und eine geringere Abfärbbarkeit.

Walcher und Stürz (1971) haben das Auftreten großer blasiger Chondrozyten festgestellt, die vermehrt basophile Substanz abschieden. Diese ließ sich mit Alcian-blau anfärben. Die durch Immobilisation herbeigeführte Stoffwechseländerung des Knorpels wird nach Salter und Field (1960) in drei Stufen eingeleitet. Sie beginnt mit dem Verlust der Kernfärbung und endet mit der völligen Knorpelzerstörung.

Evans, Eggers, Butler und Blumel (1960) fanden Zystenbildungen im Bereich der Druckzone und einen Zusammenhang zwischen der Dickenzunahme der Knorpelschicht und dem Verlust der obersten Zellage. Matthias und Glupe (1966) berichteten in ihren Versuchen von makroskopisch sichtbaren Kapselschrumpfung, Einwachsen von Bindegewebe in den Gelenkinnenraum, Verminderung der Synovialflüssigkeit, Lockerung der Bänder und "Blauverfärbung" des Gelenkknorpels. Sie beschrieben eine mikroskopisch sichtbare Verminderung der Knorpelschicht bis zum völligen Knorpelverlust und starker subchondraler Knochenathrophie. Andere Autoren, wie Küntscher (1957) und Trias (1961), sahen entweder nur geringe makroskopische und histologische oder keine Veränderungen des Knorpels nach Ruhigstellung des Gelenkes.

Diese widersprüchlichen Ergebnisse sind möglicherweise Folge des abweichenden experimentellen Vorgehens. Der Grad der Ruhigstellung, Fixation der Gelenke, Belastungsstärke, Belastungsdauer und Alter der Tiere waren unterschiedlich.

Andere Autoren versuchten, die Reaktion des Gelenkknorpels auf mechanische Belastung im Lauf- oder Kontusionsexperiment zu erfassen (Richter, 1977; Puhl et al., 1972; Gritzka et al., 1973; Gédéon, 1978). Auch diese Ergebnisse, die unterschiedliches Knorpelzell- und Interstitiumverhalten zeigen, lassen sich aufgrund unterschiedlicher experimenteller Ansätze und Durchführungen nicht vergleichen.

Ich sollte daher mit vorliegender Untersuchung das histochemische Verhalten der Knorpelgrundsubstanz nach Belastung durch das Laufband bei Gelenkknorpeln von Meerschweinchen erfassen. Außerdem sollten folgende Fragen beantwortet werden:

Wie verhält sich die Knorpelzelle nach mechanischer Belastung in Hinsicht auf ihren Metabolismus?

Kommt es zu einer Veränderung des Glykogengehaltes des Chondrocyten nach Belastung?

Verändert sich die chemische Zusammensetzung der intercellulären Matrix des Knorpels nach Belastung?

Kommt es zu einer quantitativen Vermehrung der Interterritorialsubstanz?

2. Material und Methode

a) Material

Für unseren Versuch, die Folgen der dynamischen Belastung der Kniegelenke zu erforschen, haben wir Meerschweinchen ausgewählt.

Es sind relativ träge, bewegungsarme Tiere, die eher eine Reaktion des Knorpels auf Laufarbeit erwarten ließen, als andere Nagetiere wie z.B. Ratten oder Mäuse.

Um standardisierte Bedingungen zu erhalten, wurden Vorversuche unternommen.

Insgesamt 40 ausgewachsene (Ausgangsgewicht zwischen 425 bis 850 Gramm), etwa 6 Monate alte Meerschweinchen standen uns zur Verfügung. Die Tiere⁺ wurden vor und während des Versuches ausreichend mit Standardfutter und Wasser versorgt.

Sie liefen auf vier Bändern mit jeweils drei (Bild 1) abgetrennten Laufboxen. Die Bänder wurden von Motoren⁺⁺ mit veränderbarer Umdrehungsgeschwindigkeit angetrieben und waren so konstruiert⁺⁺⁺, daß sich die Tiere gegen die Laufrichtung des Bandes fortbewegen mußten.

Während des Versuches starben einige Tiere, andere liefen die geforderte Strecke nicht in der vorgegebenen Zeit und mußten längere Ruhepausen einlegen.

⁺ Inzuchtrasse "perbright white" der Firma Bäumler, Wolfrathshausen

⁺⁺ Die Motoren wurden von der Firma Becker, Herborn, gestellt.

⁺⁺⁺ Für die Konstruktion danken wir Herrn Schneider aus der feinmechanischen Werkstatt des Physiologischen Instituts der Johannes Gutenberg-Universität, Mainz.

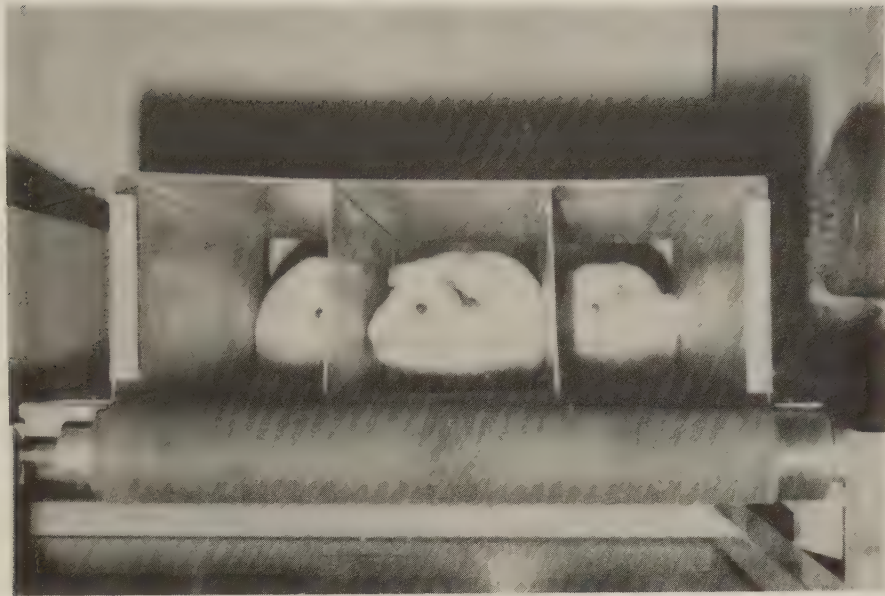


Abb. 1 Laufband

Die längste Strecke, die zurückgelegt wurde, betrug 11.400 m. Insgesamt konnten die Tiere in folgende Gruppen eingeteilt werden:

Gruppe	Anzahl der Tiere	Laufstrecke
A	8	0 m
B	3	3.200 m
C	5	8.600 m
D	14	11.400 m

Die Meerschweinchen wurden durch eine i.p. Injektion einer Überdosis Nembutal^R getötet, die Kniegelenke sofort herauspräpariert, wobei wir darauf geachtet haben, am Gelenkknorpel möglichst keine Läsionen zu setzen.

Sofort nach Abschluß der Präparation wurde das Gewebe in eine feuchte Kammer (physiologische Kochsalzlösung) eingelegt, wodurch der Austrocknung an der Luft und dadurch bedingte Veränderung der physikalisch-chemischen Zustandes des Gelenkknorpels vorgebeugt wurde. Dann erfolgte Fixierung in 10 % Formalin, Entkalkung in 5%iger Salpetersäure und

Natriumsulfat-Nachbehandlung, Einbettung in Paraffin, Schneiden des Gewebes mit dem Mikrotom in 10 µm dicke Schnitte. Die Blöcke wurden so orientiert, daß senkrecht zur Gelenkoberfläche geschnitten wurde. Denn nur bei Serienschnitten oder bei einigermaßen definierter Schnittebene lassen sich regionale Vergleiche bzw. Unterschiede treffen.

b) Methode

Nach der Vorbehandlung der Schnitte mit Xylol zum Herauslösen des Paraffins und der "absteigenden" Alkoholreihe (98 %, 96 %, 80 % Alkohol) wurden bei allen vier Gruppen folgende Reaktionen durchgeführt:

1. Glykogenfärbung nach Best

1.1 Vorbehandlung = entparaffinierte Schnitte

1.2 Abspülen mit destilliertem Wasser

1.3 Kernfärbung mit Hämalun ca. 15 Min.

1.4 Wässern in Leitungswasser (bläuen) ca. 10 Min.

1.5 Best'sches Karmin 15 Min.

(Lösung: 2 g Karmin

1 g K_2CO_3

5 g KCl und

60 ml Aqua dest.,

wurde aufgekocht, dann abgekühlt und zu dieser 20 ml Ammoniak zugegeben, danach wurde sie filtriert.)

1.6 Mit der Differenzier-Lösung gewaschen (einige Sekunden)

(Differenzier-Lösung: 20 ml absoluter Äthylalkohol

10 ml absoluter Methylalkohol

25 ml destilliertes Wasser)

1.7 mit Alkohol gewaschen (aufsteigende Alkoholreihe 80 %, 96 %, 98 %, einige Minuten)

1.8 mit Xylol gehellt

1.9 mit Eukitt eingedeckt

An einigen Präparaten wurde vor der Best'schen Karminfärbung die Probe auf Löslichkeit in Speichel durchgeführt.

2. PAS-Reaktion auf neutrale Mucopolysaccharide der Knorpelgrundsubstanz

- 2.1 Vorbehandlung und Abspülen der Schnitte mit Aqua dest.
- 2.2 10-30 Min. in 1 % Perjodsäure tauchen
- 2.3 5 Min. in Leitungswasser waschen
- 2.4 30 Min. in Schiff'sches Reagens tauchen, bis die Schnitte rosa-rot werden
- 2.5 5 Min. in Leitungswasser waschen
- 2.6 10 Min. Kernfärbung in Hämalun
- 2.7 10 Min. Bläuen in Leitungswasser
- 2.8 mit Alkohol waschen (einige Minuten in aufsteigender Alkoholreihe)
- 2.9 mit Xylol klären und
- 2.10 mit Eukitt eindecken

3. Alcianblau-PAS Färbung (saure Mucopolysaccharide)

- 3.1 Vorbehandlung und Abspülen der Schnitte in destilliertem Wasser
- 3.2 5 Min. in eine 3%ige Essigsäure-Lösung tauchen
- 3.3 2 Stunden in 1%ige Alcianblau-Lösung
- 3.4 Auswaschen in destilliertem Wasser
- 3.5 5 Min. in 3%ige Essigsäure-Lösung
- 3.6 Auswaschen unter Leitungswasser (1-2 Min.)
- 3.7 siehe PAS-Färbung 2.2 bis 2.10

4. Toluidinblaufärbung auf Metachromasie der Knorpelgrundsubstanz

- 4.1 Vorbehandlung
- 4.2 Eintauchen der Schnitte in eine 0,1%ige Toluidinblaulösung bei pH 5,6 für 30 Min.
- 4.3 Spülen mit Puffer bei gleichem pH
(Der Puffer setzt sich zusammen aus 20 ml Lösung A und 80 ml Lösung B.
Lösung A: 2,85 ml Eisessig werden mit destilliertem Wasser auf 500 ml aufgefüllt.
Lösung B: 6,8 g Natriumacetat werden mit destilliertem Wasser auf 500 ml aufgefüllt.)
- 4.4 Abtrocknen mit Fließpapier
- 4.5 Eintauchen in n-Butanol, 2 Min.
- 4.6 Eindecken in Euparal

3. Befunde und Ergebnisse

Der hyaline Knorpel läßt sich histologisch in vier Schichten unterteilen. Neben der Verlaufsrichtung der kollagenen Fasern, bestimmen die unterschiedlichen Zellen die zonale Gliederung.

I. Oberflächliche Tangentialfaserschicht.

Die Zellen sind klein, abgeflacht, ihre Längsachse verläuft parallel zur Knorpeloberfläche. In dieser ersten Knorpelzone fehlen die Chondrone.

II. Übergangszone.

Hier sind die Zellen etwas größer, mit rundlicher, ovoider Form und zahlenmäßig geringer vorhanden als in der I. Zone.

III. Radiärfaserzone,

die den Hauptanteil des Knorpels ausmacht, beinhaltet eiförmige Chondrone (= Zellnester, Zellkolonnen), die in senkrecht zur Gelenkoberfläche stehenden Säulen ausgerichtet sind.

IV. In der Verkalkungszone,

die direkt an den subchondralen Knochen anschließt, sind ähnliche Zellgruppen wie in der Radiärfaserzone zu finden.

3.1 Glykogenlokalisation

Glykogen findet sich in den Knorpelzellen. Meistens handelt es sich um perinucleär gelegene Granula, die in Form von Schollen, Tropfen, Körnern oder als feingranuläres Glykogen erscheinen. Oft ist das Cytoplasma der Chondrozyten mehr oder weniger vollständig mit dichtgedrängten Glykogengranula erfüllt. In der Interzellulärsubstanz wurde Glykogen dagegen nicht nachgewiesen.

3.1.1 Kontrolltiere (Gruppe A)

Bei Tieren, die sich keinem Lauftraining unterzogen haben, zeigte sich eine unterschiedliche Glykogenverteilung. Die größte Glykogenmenge konnten wir in der III. Knorpelzone (Radiärschicht) beobachten. Das Polysaccharid füllt hier beinahe den ganzen cytoplasmatischen Raum der Chondrozyten aus. Es liegt in Form kompakter, körniger bzw. grobscholliger dunkel- bis purpurroter Granula vor (Abb. 2).

In den Chondrozyten der ersten Zone findet sich nur wenig Glykogen. Es handelt sich um kleine, unregelmäßig verteilte Granula, die sogar in

einigen Zellverbänden ganz fehlen. In den folgenden Schichten (Übergangszone und Radiärfaserzone) kommt Glykogen in den Chondrozyten diffus verteilt vor, wobei die Anfärbbarkeit in Richtung Knorpeloberfläche abnimmt (Abb. 3).



Abb. 2 Femurcondylus. Gruppe A. Glykogenreaktion (Best-Karmin)
Vergr. 400x



Abb. 3 Tibiacondylus. Gruppe A. Glykogenreaktion.
Vergr. 400x (Nachvergrößerung)

3.1.2 Gruppe B - Tiere mit 3.200 m Laufstrecke

In dieser Gruppe ist eine Abnahme des Glykogengehaltes in allen vier Schichten in den Chondrozyten festzustellen. Man stellt, ähnlich der Gruppe der Kontrolltiere eine starke Reaktion in der III. und II. Knorpelzone fest und zwar eine granuläre, körnige fast die ganzen Chondrone ausfüllende Glykogenverteilung in der III. Zone und eine in der Anfärbbarkeit etwas schwächere, diffuse Glykogenverteilung in der II. Zone. Die I. Zone (Tangentialzone) zeigte praktisch keine Reaktion. Die IV. (Verkalkungszone) ließ kleine, vereinzelte, die innere Chondrozytenwand berührende Granula erkennen, andere Chondrone zeigten keine Reaktion (Abb. 4).



Abb. 4 Femurcondylus. Gruppe B. Glykogenreaktion (basale Zone)
Vergr. 400 x (Nachvergrößerung)

3.1.3 Gruppe C - Tiere mit 8.600 m Laufstrecke

Charakteristisch für diese Gruppe ist ein noch größerer Glykogenschwund. Im Vergleich zur Gruppe B zeigt lediglich die III. Knorpelzone noch größere allerdings schwächer anfärbbare Granula; die restlichen drei Knorpelzonen weisen eine starke Verminderung des Glykogendepots auf. Im Vergleich zur Gruppe B reagiert neben der Tangentialschicht auch die II. Zone praktisch nicht.

3.1.4 Gruppe D - Tiere mit 11.400 m Laufstrecke in etwa 6 Wochen

Aus den Untersuchungen über die Verteilung des Glykogens in den Chondrozyten der Tiere, die die gesamte Strecke zurückgelegt haben, ergibt sich folgendes Bild:

Die ersten zwei Zonen sind glykogenfrei. In der III. Zone ist eine sehr starke Reduktion des Glykogengehaltes festzustellen, was eine kaum sichtbare Reaktion ergibt. Die IV. Zone behält etwa das gleiche Bild wie bei der Gruppe C. Es scheint, als wären die Zonen III und IV bei dieser Laufgruppe verbreitert zu Lasten der restlichen zwei Knorpelzonen (Abb. 5).



Abb. 5 Femur - Gruppe D - Glykogenreaktion
Vergr. 400 x

In allen untersuchten Schnitten waren die Chondrozyten der Zonen I und II von Glykogen frei. Sie schienen entleert zu sein, während in den basalen Zonen eine positive Reaktion zu beobachten war.

3.2 PAS-Reaktion

3.2.1 Kontrolltiere Gruppe A

Die Tangentialschicht reagiert schwach positiv. Dies macht sich bemerkbar in einer schwach roten Färbung der Interzellulärsubstanz. Sie setzt sich in eine stark reagierende Schicht über, die praktisch alle drei restlichen Knorpelzonen erfaßt und die sich intensiv rot bis purpurrot färbt. Besonders stark reagieren die Knorpelzellkapseln (die äußeren Zellhöfe). Die Intensität der Farbreaktion nimmt mit der Entfernung von der Knorpeloberfläche zu und ist so an der Knorpel-Knochengrenze am stärksten ausgeprägt. Die Konzentration der Mucopolysaccharide nimmt also mit zunehmendem Abstand von der Gelenkoberfläche zu. Das Cytoplasma der Knorpelzellen reagiert auch PAS-positiv und läßt schwach- bis dunkelrot gefärbte Granula erkennen, die wir als PAS-positive Substanzen bezeichnen (Abb. 6).

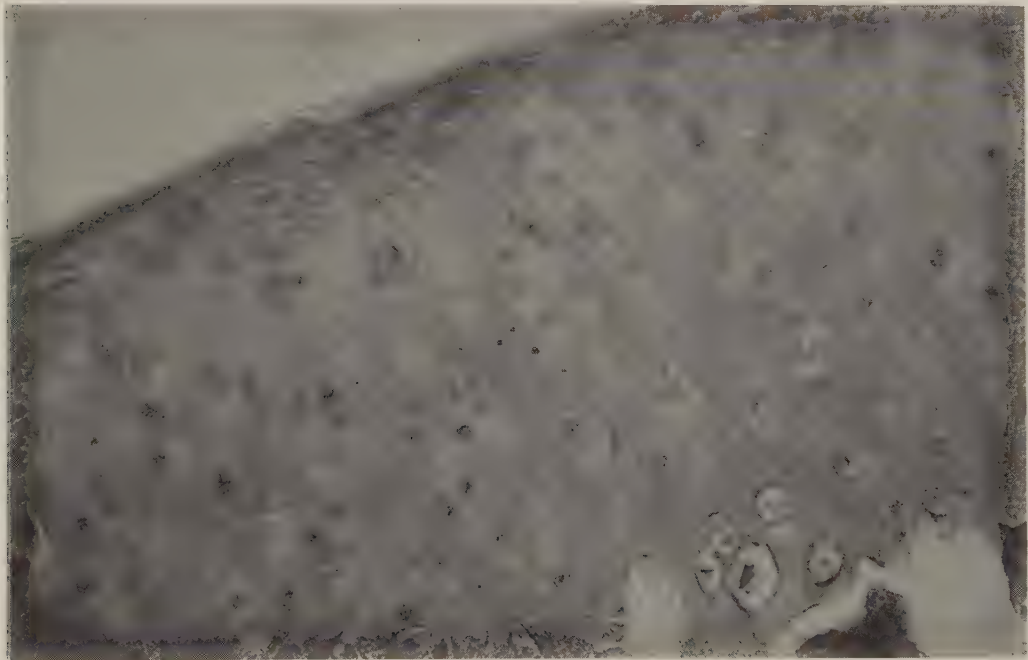


Abb. 6 Femurcondylus - PAS-Färbung
Vergr. 400x

3.2.2 Gruppe B - Tiere mit 3.200 m Laufstrecke

Der Übergang zwischen einzelnen Schichten ist unscharf. Die flachzellige Schicht der Knorpelperipherie zeigt praktisch keine PAS-Reaktion. Die Reaktionsintensität nimmt von der Oberfläche zum Zentrum gleichmäßig zu. Die Interterritorials substanz färbt sich stark rot an, jedoch wesentlich schwächer im Vergleich zur Gruppe A. Die äußeren Zellhöfe setzen sich mit ihrer Farbintensität deutlich von der Interzellularsubstanz ab, die auch nur schwach positiv reagierende Bezirke erkennen läßt. Ihre Färbintensität entspricht stellenweise der Cytoplasmareaktion der Knorpelzellen. Auch die PAS-positiv reagierenden Granula der Chondrozyten färben sich im Vergleich zur Gruppe A schwächer ein (Abb. 7).



Abb. 7 Femur - Gruppe B - PAS-Reaktion
Vergr. 400 x

3.2.3 Gruppe C - Tiere mit 8.600 m Laufstrecke

Es ist eine deutliche Abnahme der PAS-Reaktion festzustellen. Nur in der III. und IV. Knorpelzone kann man noch von einer PAS-positiven Reaktion sprechen, die sich nur auf die Bezirke um die Zellhöfe konzentriert, während die Interzellularsubstanz sonst nur noch sehr schwach reagiert bzw. ungefärbt bleibt. PAS-positiv reagierende Granula haben jedoch in den Chondrozyten an Menge und Färbintensität zugenommen.

3.2.4 Gruppe D - Tiere mit 11.400 m Laufstrecke

Die Paraffinschnitte dieser Gruppen lassen im Interterritorium keine PAS-Reaktion erkennen, wohl aber in den Zellen (Abb. 8).

Die vier Knorpelzonen weisen praktisch keine farblichen Unterschiede mehr auf. So lassen sich auch im Vergleich zu den vorigen drei Gruppen die Zellnester kaum gegen die Interterritorialschicht abgrenzen, die sich diffus angefärbt hat.



Abb. 8 Femur - Gruppe D - PAS-Reaktion
Vergr. 400 x (Nachvergrößerung)

3.3 Alcianblue-PAS-Reaktion

3.3.1 Kontrolltiere Gruppe A - Tiere ohne Laufbelastung

Die Analyse der Schnitte ergibt, daß die Alcianblue-PAS-Reaktion praktisch nur in den tieferen Knorpelzonen stattfindet. Hier weisen die Zellhöfe in eindrucksvollen blau bis blauvioletten Farbtönen eine positive Reaktion auf. Die Tangentialschicht bleibt ungefärbt, in der Übergangszone ist nur eine sehr schwache Reaktion der Zellkapseln zu beobachten. (Abb. 9).

Die Interterritorials substanz reagiert ebenfalls nur in tiefsten Knorpelschichten. In den Chondronen stellen wir dunkel- bis purpurrot gefärbte Granula fest, die z.T. den ganzen Zelleib ausfüllen und als PAS-positive Substanzen zu verstehen sind (Abb. 10, 11).

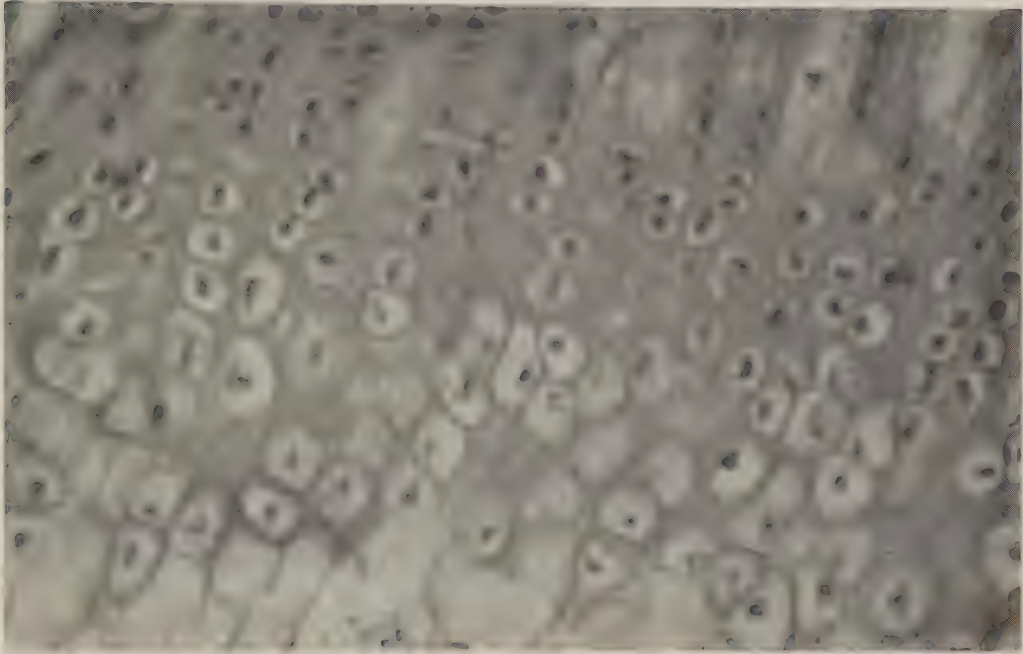


Abb. 9 Femur - Gruppe A - Alcianblue-PAS-Reaktion
Vergr. 400 x (Nachvergrößerung)



Abb. 10 Tibia - Gruppe A - Alcianblue-PAS-Reaktion
Vergr. 400 x

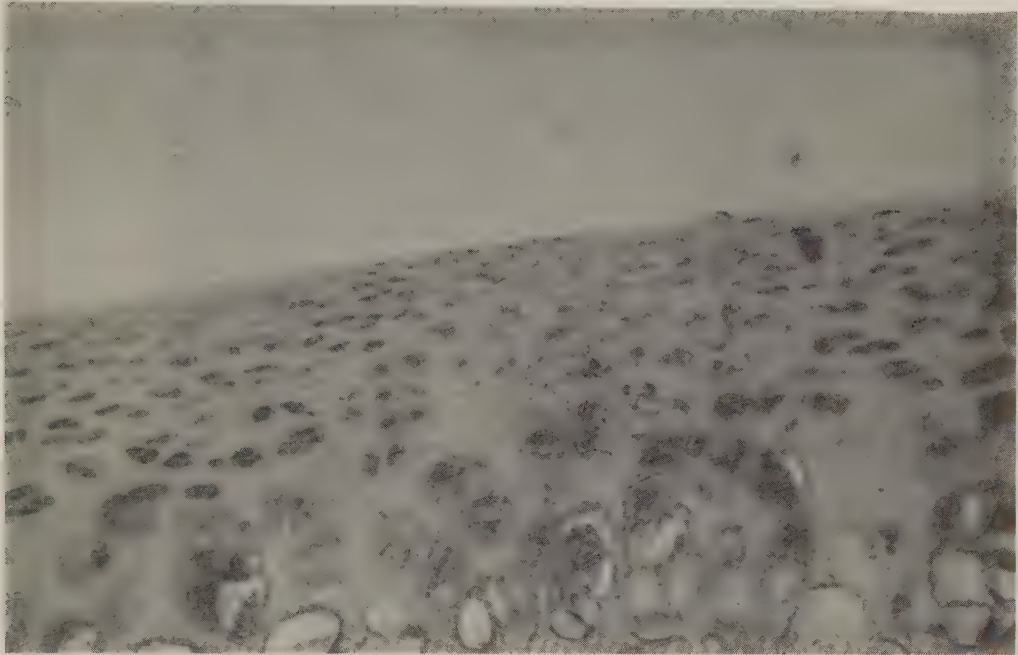


Abb. 11 Femurcondylus - Gruppe A - Alcianblue-PAS-Reaktion
Vergr. 400 x

3.3.2 Gruppe B - Tiere mit 3.200 m Laufstrecke

Es zeigt sich hier ein Bild, das der Gruppe A ähnelt: starke Reaktion der äußeren Zellhöfe der tieferen Knorpelpartien mit eingelagerten Alcianblue-PAS-positiv reagierenden Granula. Die Reaktion der Interterritorialsubstanz ist etwas schwächer (Abb. 12, 13).

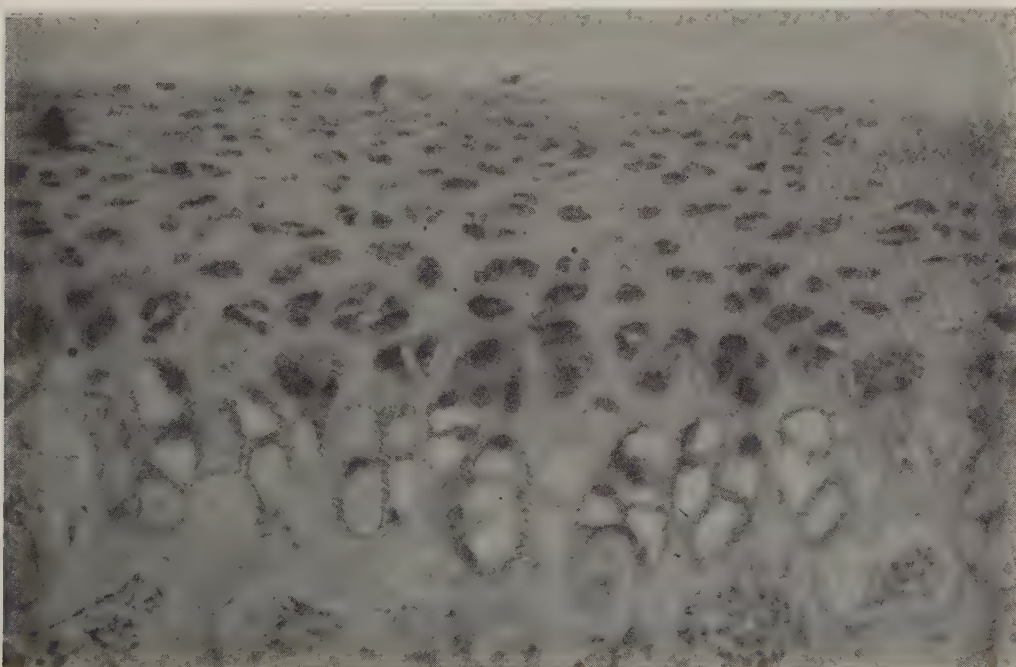


Abb. 12
Femur - Gruppe B
Alcianblue-PAS-
Reaktion
Vergr. 400 x

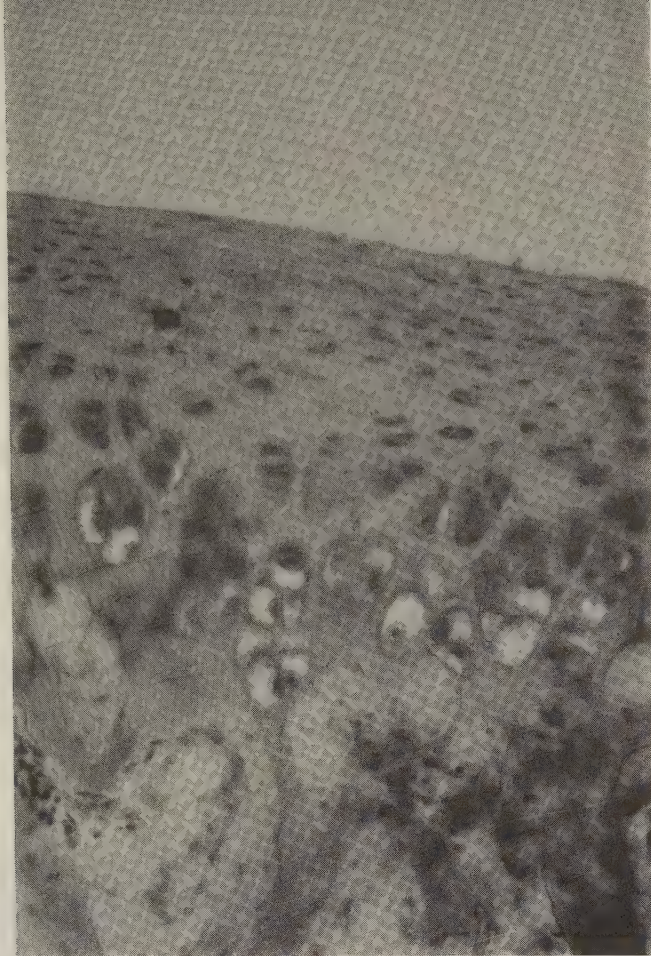


Abb. 13 Tibia - Gruppe B - Alcianblue-PAS-Reaktion
Vergr. 400 x (Nachvergrößerung)

3.3.3 Gruppe C - Tiere mit 8.600 m Laufstrecke

Die Alcianblue-PAS-Reaktion bei dieser Laufgruppe ist schwach, sowohl was die Färbintensität der äußeren Zellhöfe, als auch die Reaktion der Interzellularsubstanz betrifft. Dafür nehmen die Alcianblue-PAS-positiv reagierenden Granula in den Chondrozyten an Menge leicht zu (Abb. 14).

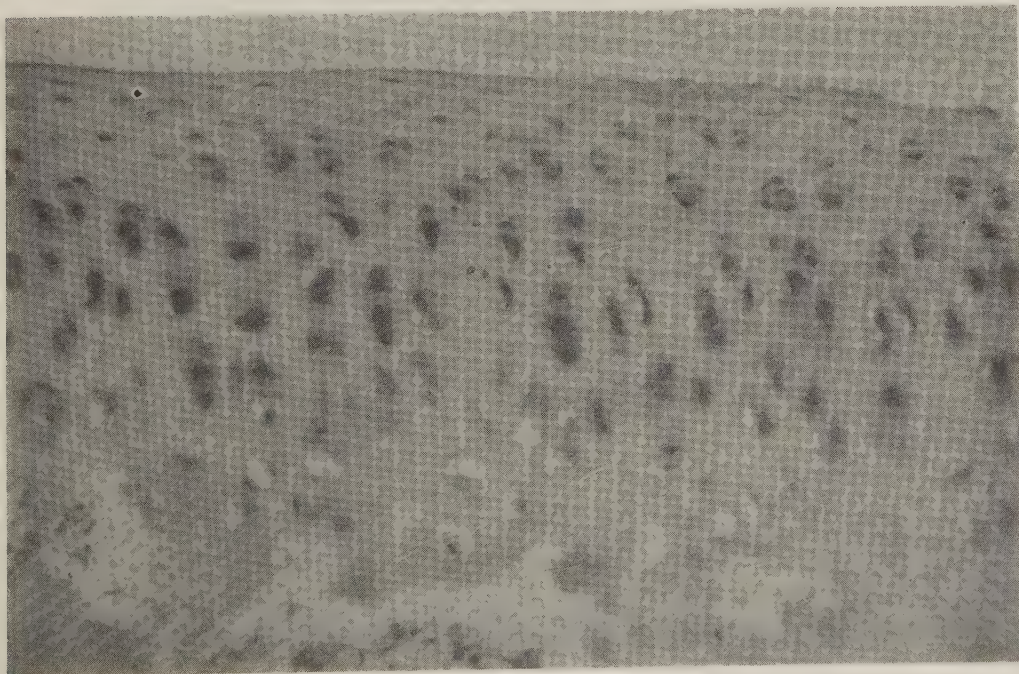


Abb. 14
Femur - Gruppe C
Alcianblue-PAS-
Reaktion
Vergr. 400 x

Bemerkenswert war jedoch, daß die III. Zone sich stark anfärbte und daß PAS-positive Granula vorwiegend in dieser Zone nachweisbar waren.

3.3.4 Gruppe D - Tiere mit 11.400 m Laufstrecke

Hier sind im Vergleich zur Gruppe C die Höfe in den tiefsten Knorpelzonen nur sehr schwach angefärbt. Sie zeichnen sich durch einen schwachen, zarten Blauton aus; in anderen Schnitten ist keine Reaktion zu beobachten. Die Reaktion der Alcianblue-PAS-positiv reagierenden Substanzen bleibt im Vergleich zur Gruppe C unverändert (Abb. 15).



Abb. 15 Femur - Gruppe D - Alcianblue-PAS-Reaktion
Vergr. 400 x

Das Interterritorium der II. und III. Zone ließ sich nicht anfärben, jedoch im Bereich der IV. Zone konnte eine Reaktion beobachtet werden.

3.4 Toluidinblau-Reaktion

3.4.1 Kontrolltiere Gruppe A

Mit Toluidinblau läßt sich die Interterritorialsubstanz der zwei obersten Knorpelschichten färberisch nicht darstellen. Die Knorpelzellen in diesen Zonen sind von einem feinen metachromatischen Hof und einer Kapsel umgeben. Die Zellen der radiären Zone und der Verkalkungszone enthalten entweder wenige feine Körnchen, oder ihr Cytoplasma ist diffus angefärbt. Auch die Interterritorialsusbstanz der III. Knorpelzone reagiert metachromatisch und färbt sich dunkelrot an (Abb. 16).

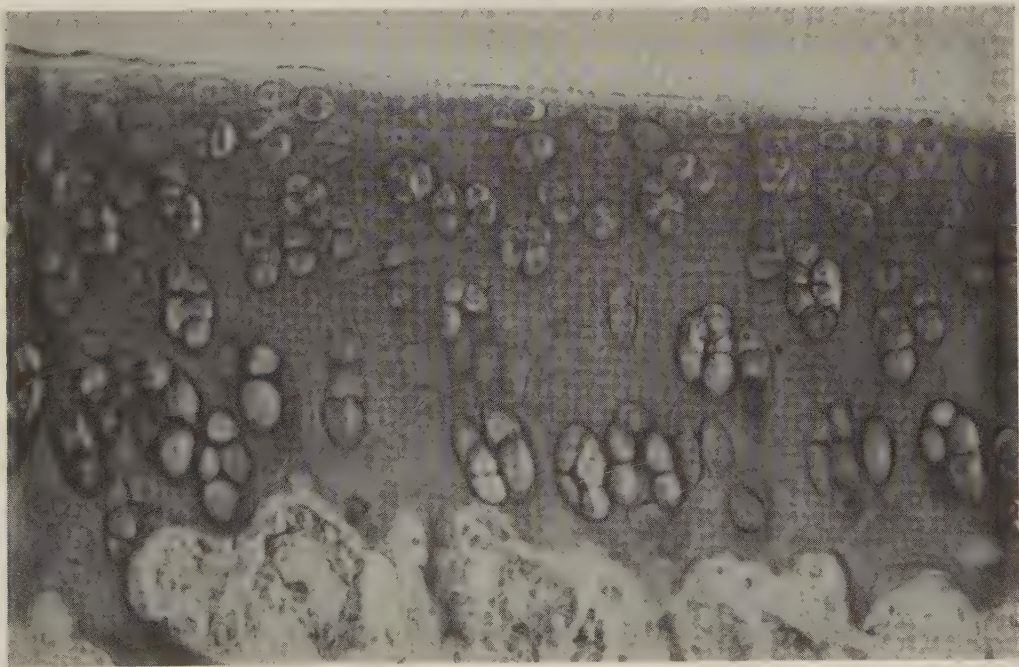


Abb. 16 Femur - Gruppe A - Toluidinblau-Reaktion
Vergr. 400 x

3.4.2 Gruppe B - Tiere mit 3.200 m Laufstrecke

Bei dieser Laufgruppe färben sich die Kapseln und Höfe der Chondrozyten in den obersten zwei Knorpelzonen nicht an. Ebenso bleibt die Interterritorials substanz in dieser Region ungefärbt. Dagegen reagiert sie in den zwei tiefsten Knorpelzonen stark metachromatisch. Die Zellkapseln sind nach wie vor ziemlich intensiv metachromatisch gefärbt und lassen sich gut gegen die Interterritorials substanz abgrenzen.

3.4.3 Gruppe C - Tiere mit 8.600 m Laufstrecke

In der oberflächlichen Lage reagieren keine Bestandteile metachromatisch. Die Interterritorials substanz der II. Zone läßt Bezirke erkennen, die eine diskrete metachromatische Reaktion aufweisen. Sie geht stufenlos in eine etwas stärker gefärbte Interzellularsubstanz der III. und IV. Zone über, die jedoch stellenweise metachromatisch-negative Bezirke erkennen läßt. Zellnester färben sich in dieser Region stark metachromatisch an. Knorpelzellen der tieferen Schichten lassen nur vereinzelt Granula erkennen.

3.4.4 Gruppe D - Tiere mit 11.400 m Laufstrecke

Die Knorpelschnitte reagieren in allen Zonen leicht metachromatisch. Auch die Granula in den Chondrozyten sind jetzt über die ganze Knorpelschicht verteilt.

Die Zellnester sind gut gegen die Interzellularsubstanz darstellbar, auch wenn ihre Färbintensität im Vergleich zur letzten Gruppe nachgelassen hat. Eine zonale Gliederung ist nicht mehr festzustellen, die Zonen gehen ineinander über.

4. Diskussion

In der Literatur gibt es mannigfaltige Hinweise, wie hyaliner Knorpel auf verschiedene Belastungen reagiert. Die meisten Autoren beschäftigen sich mit Druckbelastung, mechanischer Schädigung oder Immobilisation menschlicher oder tierischer Gelenke. In der Einleitung sind wir kurz auf die Art der Spezies, der Gelenke, das experimentelle Vorgehen und die Versuchseinrichtungen eingegangen und haben dann die registrierten Ergebnisse geschildert, die je nach Experiment erheblich variieren. Deshalb sind Vergleiche mit Ergebnissen aus der Literatur mit äußerstem Vorbehalt zu ziehen.

Der Ablauf der Gelenkfunktion hängt von vielen Einzelfaktoren ab: Die Konstruktion des Gelenkes, die Form seiner Bewegungsflächen, ihre Oberflächengestaltung, ihr Feinbau, Art und Größe der Belastungsverhältnisse, Zustand der Muskulatur, Durchblutung und Stoffwechselsituationen. Der Gelenkknorpel benötigt, um seine biologische und mechanische Aufgabe erfüllen zu können ein bestimmtes Maß an Elastizität und Härte, gleichbleibende Glätte der Oberfläche und innere Festigkeit. Wichtigste Voraussetzungen dafür sind 1. seine Faserstrukturen und 2. die Eigenschaften der Grundsubstanz (= Interzellularsubstanz) und 3. seine zelligen Bestandteile. Bei der Untersuchung der Faserstrukturen ergibt sich eine Anordnung, die in den verschiedenen Teilen ein und desselben Gelenkes je nach unterschiedlicher funktioneller Beanspruchung wechselt, aber sowohl unter normalen wie unter veränderten Bedingungen Gesetzmäßigkeiten erkennen läßt. (Rössler 1961).

Er beschreibt im alternden Knorpel eine Vergröberung sowohl der Grundsubstanz bei gleichzeitig eingeschränktem Wasserbindungsvermögen als auch der Faserstruktur.

Was die Grundsubstanz und somit die sauren Mucopolysaccharide angeht, so kann man folgendes festhalten:

Intrazelluläre MPS wurden inzwischen nicht nur durch Färbereaktionen sondern auch durch Autoradiographie nachgewiesen. Mit Hilfe von S^{35} kann die intrazelluläre Entstehung der "Sulfo"-Mucopolysaccharide eindeutig bestimmt werden. Die verschiedenen Bindegewebspolysaccharide unterscheiden sich in Hinblick auf ihre Stoffwechselaktivität, was z.B. im Epiphysenknorpel des Hundes Bentley und Rokosová (1970) beschrieben haben. Herbai und Lindahl (1970) erwähnen in der Rippe

eine höhere Stoffwechselaktivität an der Knorpelknochen-Grenze als in den übrigen Teilen.

Lempert et al. (1974) konnte analog zu unserer Arbeit mit zunehmendem Abstand von der Gelenkoberfläche eine Konzentrationszunahme der Glykosaminoglykane nachweisen.

Andere Autoren haben versucht, die sauren Mucopolysaccharide mit verschiedenen Methoden histochemisch nachzuweisen. Auffällig ist, daß sich in den Lehrbüchern der histologischen Topochemie kaum übereinstimmende Angaben darüber finden, wie sich saure Mucopolysaccharide mit diesen verschiedenen Reaktionen und Färbungen darstellen lassen (Müller, 1959). In unserer Arbeit haben wir den histologischen Nachweis saurer Mucopolysaccharide mit Hilfe der Alcianblue-PAS- und Toluidinblaureaktionen durchgeführt. Da sich saure und neutrale Mucopolysaccharide in Knorpel mit PAS anfärben lassen wurde diese Reaktion durchgeführt. Die PAS-Reaktion fiel in der Interzellulärsubstanz der Kontrolltiere am stärksten im Bezirk der äußeren Zellhöfe auf. Ihre Färbintensität hat mit längerer Laufübung so abgenommen, daß die Knorpelzonen kaum noch anfärbbare Bereiche aufweisen konnten und wir somit eine kontinuierliche Abnahme der Mucopolysaccharide nach Laufbelastung feststellen konnten, die auch im Vergleich zu unbelasteten Tieren am stärksten in den zwei tiefsten Knorpelzonen war. In den Chondrozyten konnten wir eine leichte Zunahme der PAS-positiven Substanzen nach dem Lauftraining registrieren. Bei der Alcianblue-PAS-Reaktion konnten wir die gleichen Ergebnisse feststellen. Auch Knese (1979) weist auf die Alcianblue-Anfärbung der Kapseln und die PAS-Reaktion der Interzellulärsubstanz im menschlichen Rippenknorpel hin. Die unterschiedliche Anfärbung der Interzellulärsubstanz mit Alcianblau führen Stockwell und Scott (1965) auf die Verteilung des Keratansulfats zurück. Andere Verfasser, die den Gelenkknorpel mit gleichen Reaktionen untersuchten, befassen sich nur mit Individuen ohne Belastung und somit sind ihre Resultate nur mit unseren Kontrolltieren vergleichbar. So fand Knese (1979) mit zunehmendem Abstand von der Gelenkoberfläche eine Zunahme der Konzentration der Glykosaminoglykane; (Lempert et al., 1974) bei Kälbern und Färsen soll es sich um Chondroitinsulfat handeln. Vignon (1971) untersuchte menschliche Gelenkknorpel bei Erwachsenen und fand, daß der Glykosaminoglykangehalt in der Matrix (Grundsubstanz) abnimmt, wenn man sich der Oberfläche nähert. Und zwar sollen sich

Glykosaminoglykane in größeren Mengen und perichondrozytär in den tieferen Knorpelzonen finden, weniger zahlreich und mehr diffus verteilt in der intermediären Zone, während sie in der oberflächlichen Knorpelzone praktisch nicht vorhanden sind.

Er stellt zwischen der radiären und Verkalkungszone keinen allmählichen Übergang fest, wie wir in unserem Versuch auch feststellen konnten, sondern eine dünne, gewellte, basophile Trennlinie: "Ligne bordante" wie auch Fawns und Landells (1953) oder Mankin (1967), der sie "tidemark" bezeichnet.

Ähnlich zeigten Müller (1959) bei menschlichen Rippenknorpeln und Leppelmann (1959) bei menschlichen Kniegelenkknorpeln eine Zunahme der Chondroitinschwefelsäure zur Knorpelknochengrenze. Arent (1970) konnte bei menschlichen Gelenkknorpeln mit keiner Methode in der Interzellularsubstanz der Deckschicht und der subperichondralen Zone saure Mucopolysaccharide erfassen. Nur im Bereich der Zellkapseln und des Zellinhaltes ergaben sich Hinweise auf die Anwesenheit von freien stark dissoziierte Sulfatnestern. Graumann (1964) fand ebenfalls im jüngeren Rippenknorpel (Kaninchen) in der Knorpelperipherie keine Perjodatreaktivität und eine gleichmäßige Abnahme der Reaktionsintensität (altersabhängig) vom Zentrum der Oberfläche.

Diese Färbungen decken sich dagegen nicht mit dem Ergebnis der Perjodsäure-Leukofuchsin-Reaktion. Die Perjodreaktivität der Knorpelgrundsubstanz ist subperichondral und im Bereich der Knorpelkapseln stark ausgeprägt, während weite Bezirke im Zentrum der Knorpelstücke (Ulnaepiphyse, 6 Tage alter Hamster) unter Umständen praktisch reaktionslos bleiben (Glegg et al., 1952; Graumann 1953b). Abweichend davon beschreiben Rizzoli und Mastrobuono (1953), daß bei erwachsenen Nagern und bei Menschen die Interzellularsubstanz stark perjodatreaktiv sei, während Zellkapseln und Territorien kaum reagieren sollen (Graumann 1964).

Zahlreiche Autoren vertreten die Auffassung, daß die sauren MPS PAS-negativ reagieren (Hooghwinkel und Smits (1957), Leblond et al., (1957), Hoffmann und Meyer (1962), Kobayashi (1964), Palladini und Lauro (1968)).

Otte (1965) hat mit der PAS-Methode beim gelenkgesunden Erwachsenen eine kräftige Reaktion der Deckschicht, dagegen in der subperichondralen Zone eine schwache oder arealweise gar keine Reaktion gefunden. Collins und McElligott (1960), Fawns und Landells (1953) haben keine solchen unterschiedlichen Anfärbungsmuster beobachtet (Arendt 1970). Eine PAS-positive Reaktion geben die neutralen Mucopolysaccharide nach Lison (1932), Lillie (1950), Joel et al., (1956), Hooghwinkel und Smits (1957), Zugibe et al., (1959).

Eine PAS-positive Reaktion fanden auch Földes et al. (1965) nach Susa-Fixierung in allen Zonen der Epiphyse bei 30 Tage alten Ratten, die am stärksten in der hypertrophen Region ausgefallen ist. Bei 85 Tage alten Tieren hat hier eine Reaktion gefehlt. Bona et al. (1964) berichten demgegenüber von einer Abnahme der PAS-Reaktion zu den hypertrophen Zellen. Die Interzellulärsubstanz der Epiphyse färbt sich nach van den Hooff (1964) zunächst überwiegend mit Alcianblau an. Mit dem Alter nimmt die Alcianophilie und die Metachromotropie (Graumann 1964) ab, die PAS-Reaktion aber zu, was auch Maibach (1963) und Knese (1979) aufgefallen war. Andere Verfasser untersuchten die PAS-Reaktion während der Chondrogenese.

Knese (1979) stellt bereits bei Rinderfeten (größer als 30 mm SSL) in den meisten Mesenchymzellen eine positive PAS-Reaktion fest. Nach Graumann (1952a) ist die Knorpelgrundsubstanz bereits in Vorknorpelblastemen (Maus 5 mm und 13,5 mm) perjodatreaktiv. Auch bei der Ratte ist ebenfalls eine, wenn auch geringere Perjodatreaktivität festgestellt worden (Seo 1955). Canepa (1956a) untersuchte menschliche Rippenknorpel und stellte beim Neugeborenen zunächst keine Perjodatreaktivität, sondern ein allmähliches Auftreten dieser in den ersten Lebensmonaten fest. Svejcar (1968) entdeckte im Knorpel bereits während der foetalen Entwicklung (bei Mäusefeten am 12.-13. Schwangerschaftstag) Chondroitin-4-Sulfat.

Einige Autoren versuchten die Ursachen der PAS-Reaktion-Zunahme im höheren Alter zu erforschen. Als Gründe werden angegeben: höherer Polymerisationsgrad mit steigendem Alter (Loewi 1953, Rizzoli und Mastrobuono 1953), Verkalkungsprozesse (Loewi 1953), durch Zunahme

neutraler Polysaccharide und Abnahme der Chondroitinsulfatkonzentration (Joel et al. 1956), vermehrtes Auftreten von Keratansulfat (Maibach 1963), der auch erwähnt, daß ein Teil der PAS-Färbbarkeit durch den Glykogengehalt des Knorpels bedingt ist.

Rüttner et al. (1974) erwähnen neben dem Wasserverlust mit zunehmendem Lebensalter auch die Abnahme des Gesamtgehaltes der Glykosaminoglykane und eine vermehrte katabole Tätigkeit der Chondrozyten während des Alterns.

Sie konnten weiterhin zeigen, daß das Altern morphologisch ein Nebeneinander regressiver und reparativer Vorgänge darstellt, wobei die ersteren überwiegen. Sie konnten außerdem Zelluntergänge, Zellproliferationen, Dickenwachstum der kollagenen Fasern verbunden mit Deformierungen und unregelmäßiger Anordnung in der Knorpelmatrix beobachten.

Vinel (1970) beschreibt wiederum eine während des Alterns unveränderte Gesamtstruktur des Gelenkknorpels und einen Rückgang der zellulären Dichte, besonders in der Oberflächenschicht.

Untersuchungen über die regionalen Differenzen in Epiphysen wurden bisher nicht systematisch durchgeführt. Eine große Zahl von Substanzen gibt PAS-positive Reaktion z.B. viele Polysaccharide (u.a. Glykogen), Glykoproteine (Kollagen, Retikulin), Glykolipide, Phospholipide.

Ähnlich unterschiedliche Ergebnisse zeigt uns die Literatur bezüglich der Metachromasie der Knorpelgrundsubstanz mit Toluidinblau.

Die Knorpelgrundsubstanz läßt sich mit basischen Farbstoffen (vor allem Toluidinblau) metachromatisch färben (Holmgren 1939, Wislocki et al. 1947a). Toluidinblau metachromasie und PAS-Reaktion sollen sich in ihrer Stärke reziprok verhalten (Fawns und Landells, 1953, Loewi 1953, Müller 1959). Shaw et al. (1962) erwähnten nur eine Intensivierung der PAS-Reaktion gegen die Knorpeloberfläche (Maibach 1963). Die Topographie der metachromatischen Reaktion, die durch Lison (1935) erstmals beobachtet wurde, beschrieb Müller (1959), der eine besonders intensive Färbbarkeit der Knorpelzellkapseln hervorhob. Shaw et al. (1962) zeigten, daß bei Tier und Mensch die oberflächliche Gelenkknorpelschicht nicht darstellbar ist.

Maibach (1963) untersuchte menschliche Gelenke der unteren Extremitäten. Er konnte auch keine Bestandteile in der oberflächlichen Gelenkschicht mit Toluidinblau färberisch darstellen. In der tieferen Lage stellte er stark metachromatisch gefärbte Kapseln und Zellhöfe fest. In den Chondrozyten der oberen Schichten fand er weniger feine Granula, in denjenigen der tiefen Lage viele grobkörnige metachromatische Granula. Müller (1959) stellte nach der Untersuchung des menschlichen Rippenknorpels die stärkste Metachromasie in der Interterritorialsubstanz der äußeren Knorpelzone und im Bereich der Asbestfaserung fest. Sehr starke Reaktion fand er auch bei den Knorpelkapseln, eine schwächere bei den Zellhöfen. Graumann (1964) erwähnte, daß es unter dem Einfluß von Säuren (z.B. im Rahmen einer histologischen Entkalkung) zu einer raschen Abnahme der Metachromotropie kommt, während die Perjodatreaktivität erhalten bleibt.

Knese und Knoop (1961a) stellten bei Rattenfeten mit Toluidinblau bei saurem pH sowie mit Methoden zum KH-Nachweis 1-5 μ große Granula dar.

In der älteren Literatur sind zahlreiche Angaben über metachromatisch reagierende Granula in Knorpelzellen zu finden und zwar bei Färbung mit Methylenblau (Fischel 1901), Toluidinblau (Schaffer 1905), Azur (Arnold 1908) und Bismarkbraun (Nowikoff 1908).

Diese Befunde konnten jedoch aus Mangel an Kenntnissen der metachromatischen Reaktion und der Polysaccharide nicht befriedigend interpretiert werden (Knese 1979).

Mit Toluidinblau (pH 2,6 - 4,1) metachromatisch reagierende Granula nehmen an Größe und Zahl vom Appositionsknorpel zur Mitte des Epiphysenknorpels (von außen nach innen) zu (Knese und Knoop 1961a), die die später z.T. als Fixierungsartefakte bezeichnet haben (infolge der Material-Konzentration-Aggregation, Knese 1979). Die Veränderung von Größe und Färbbarkeit der Granula wird als Zeichen der Veränderung der Protein-Polysaccharide innerhalb der Epiphyse gedeutet (Knese 1979). Hirschman und McCabe (1969) meinen, daß die Färbung vom pH und Molekulargewicht des Farbstoffs abhängt.

Bona et al. (1964) berichten über eine Reaktion der Säulenknorpelzellen mit Toluidinblau, Alcianblau und Hales Eisenreaktion bei 15 Tage alten Ratten: alle anderen Regionen zeigen keine Reaktion. Isolierte Chondrozyten aus Paraffinschnitten lassen sich mit Alcianblau und metachromatisch mit Toluidinblau anfärben (Kawiak 1963a). Preto Parvis et al. (1956) und Szirmai et al. (1958) bewiesen durch Papierelektrophorese starke Metachromasie der aus Knorpel extrahierten Chondroitinschwefelsäure.

In unserer Toluidinblaureaktion konnten wir analog den Untersuchungen von Maibach (1963), Bona et al. (1964), Knese und Knoop (1961a), Shaw et al. (1962) in den oberflächlichen Knorpelzonen keine Bestandteile anfärben. Um so stärker war die Reaktion der tieferen Zonen, wobei wir ähnlich den Untersuchungen von Müller (1959) eine starke metachromatische Reaktion der Knorpelkapseln feststellen konnten. In diesen Zonen fanden wir auch feine metachromatische Granula. Wir konnten bei unseren Versuchstieren nach einer 11.400 m Laufbelastung eine metachromatische Reaktion feststellen, die sowohl die Interzellulärsubstanz als auch die Zellen betraf, und zwar nicht nur in den tiefsten Knorpelzonen, sondern über die ganze Knorpeldicke verteilt, auch wenn sie in ihrer Farbtintensität ein wenig schwächer ausgefallen ist. Es ist interessant, daß die Metachromasie nach dem vollen Absolvieren des Lauftrainings zugenommen, die PAS-Reaktion dagegen abgenommen hat. Unsere Ergebnisse sind in der Tabelle 1 zusammengefaßt.

Bevor wir auf unsere letzte Reaktion (= Bestimmung der Glykogenlokalisation) eingehen, möchten wir uns mit dem dritten (nach kollagenen Fasern und Interzellulärsubstanz) Strukturelement des Knorpels befassen, nämlich mit den Zellen.

Der Umgestaltung der Interzellulärsubstanz im hyalinen Knorpel bei Verschiebung der regionalen Grenzen geht eine Transformation der Zellgestalt und -struktur mit Änderung der Zellaktivität parallel. Die Annahme korrelierter Prozesse liegt deswegen nahe. Eine Reihe von Befunden spricht für einen Rückkoppelungsmechanismus zwischen Interzellulärsubstanz und Zelle (Follies 1952a, McElligott und Potter 1960, Morrison 1970, Knese 1979).

Tabelle 1:

Zonen	Glykogen-Reaktion				PAS-Reaktion				Alcianblue-PAS-Reaktion				Toluidinblau-Reaktion			
	I	II	III	IV	I	II	III	IV	I	II	III	IV	I	II	III	IV
Gruppe A Zellen Interzellu- larsubstanz	+	++	+++	+	(+)	+	+	+	(+)	+++	+	+			++	++
					+	++	+++	+++	(+)	+++	+++	+++			+++	+++
Gruppe B Zellen Interzellu- larsubstanz	++	+++	+	+	(+)	+	(+)	+	+	++	+	+			++	++
					(+)	+	++	++	(+)	+++	+++	+++			++	++
Gruppe C Zellen Interzellu- larsubstanz		++	(+)		+	+	+	+	+	++	++	++		+	+	+
							(+)	(+)	(+)	++	++	+		+	++	++
Gruppe D Zellen Interzellu- larsubstanz		+	(+)		+	+	++	++	+	++	++	++	(+)	(+)	+	+
							(+)	(+)		+	+	+	+	+	++	++

Darstellung der einzelnen Gruppen mit entsprechenden, färberischen Reaktionen

- +++ - sehr starke Reaktion
- ++ - starke Reaktion
- +
- (+) - sehr schwache (kaum sichtbare) Reaktion

Das unterschiedliche färberische Verhalten der Interzellulärsubstanz verschiedener Zonen des Epiphysenknorpels berechtigt zu der Annahme einer Matrixproduktion durch die Chondrozyten, was auch durch autoradiographische Untersuchungen nachgewiesen wurde (Knese und Knoop 1961a).

Wie verhalten sich die Chondrozyten während des Belastungsversuchs? Die älteste Methode des Glykogenachweises ist die 1854 von Bernard beschriebene Jodreaktion. Sie beruht auf der Feststellung, daß sich Glykogen bei Jodeinwirkung stark bräunt. Glykogen wurde während der Knorpelentwicklung relativ früh entdeckt. Graumann (1953c) kann chondrogenetische Areale bei Säugerembryonen auf Grund ihres interzellulären Glykogengehaltes bereits zu einem Zeitpunkt abgrenzen, an dem noch keinerlei blastemartige Zellverdichtung nachweisbar ist. Auch in Prächondroblasten kommt noch reichlich Glykogen vor (Pitchard 1952). Es scheint mit dem Einsetzen der Grundsubstanzbildung zunächst noch an Menge zuzunehmen (Sundberg 1924, Seo 1955), um dann allmählich mit fortschreitender Differenzierung zu verschwinden, und tritt in der reifen Knorpelzelle wieder auf (Graumann 1964).

Neumann (1870), Gendre (1938), Rizzoli und Mastrobuono (1953) Akamine et al. (1954) finden Chondroblasten im allgemeinen frei von Glykogen; mitunter wurden einige Glykogengranula beschrieben (Mancini 1948, Montagna 1949). Die Glykogenspeicherung wurde früher auch als Zeichen der Degeneration gewertet (Harris 1932).

Das frühe Erscheinen von Knorpel-Glykogen wurde u.a. von Gierke (1905; Schwein), Lubarsch (1906; Kaninchen), Gage (1906; Mensch 56 Tage), Sundberg (1924; Mensch 15-40 mm) Graumann (1952a; Maus) beschrieben.

Der mittlere Glykogengehalt in der Epiphysenscheibe der Rattentibia beträgt nach Eeg-Larsen (1956) 10-12 mg/g, wobei das Maximum mit 30-40 mg/g im Säulenknorpel liegt. Knese (1979) nimmt an, daß die Chondrozyten neben Glykogen noch andere Kohlenhydrate enthalten, er vermutet sie als MPS-Vorstufen. Er erklärt das recht verschiedenartige Verhalten benachbarter Chondrozyten mit unterschiedlichen Stoffwechselsituationen der Zellen. Glykogensynthese (Glykogenese) und ihre Verteilung über die Knorpelregionen wird in der Literatur

kaum Beachtung geschenkt. Sie soll nach Knese (1979) in der Appositionsschicht erfolgen, weil hier eine Glykogensynthetase nachgewiesen wurde. Glykogenabbau (Glygenolyse) ist ein Mobilisieren des gespeicherten Glykogens im nahrungsfreien Intervall und wird durch das Enzym Phosphorylase eingeleitet (Buddecke 1973). Hadhazy et al. (1975) untersuchten die Aktivitäten verschiedener Enzyme des Kohlenhydratstoffwechsels an Femurflächen bei Hunden.

Die Knorpelzellen färben sich, wenn auch unterschiedlich stark, bei allen Kohlenhydratreaktionen an, erweisen sich jedoch gegenüber vielen anderen Farbreaktionen als refraktär. Es werden je nach Art der Reaktion unterschiedliche Mengen färbbare Substanz sichtbar. Über das Glykogen in hyalinen Knorpel unterrichten zusammenfassende Darstellungen (Schaffer 1930, Graumann 1964), da der Nachweis von Knorpelglykogen zu den ältesten histochemischen Befunden gehört (Rouget 1859, Bernard 1859).

Zur Sichtbarmachung des Glykogens in Gewebeschnitten sind eine Reihe von Methoden entwickelt worden (Pearse 1968, Romeis 1948). So benutzten Opitz und Dorsche (1973) neben der Carminfärbung nach Best noch die Alizarinderivate zur Darstellung des Glykogens an Lebergewebe bei Ratten und Meerschweinchen. Stockwell (1967) untersuchte Glykogengehalt bei Kaninchen. Sie und die meisten anderen Autoren fanden die größten Glykogenmengen in den tieferen Knorpelschichten. In den Zellen des Perichondriums soll (Gendre 1938, Akamine et al. 1954) ebenso wie im flachzelligen Oberflächenknorpel Glykogen fehlen (Graumann 1964). Es sind jedoch auch positive Glykogenbefunde erhoben worden (Mancini 1948).

In unserem Versuch, die Glykogenlokalisation im Gelenkknorpel mit dem Carmin nach Best darzustellen, haben wir in Übereinstimmung mit o.g. Autoren die meiste Glykogenmenge in der Radiärschicht anfärben können. Die kompakten, körnigen dunkel- bis purpurroten Granula füllen hier den ganzen cytoplasmatischen Raum der Chondrozyten aus. In der Verkalkungszone konnten wir kleine, unregelmäßig verteilte Granula finden, während sich das Glykogen in den obersten zwei Knorpelzonen, diffus verteilt, zeigt. Nach der Laufbelastung stellten wir eine starke Glykogenabnahme in allen vier Schichten, und nur noch in der Radiärschicht kleine, vereinzelte Granula fest. Als Nebenfund glaubten wir, eine Verbreiterung der 3. und 4. Knorpelzone auf Kosten

der beiden anderen beobachten zu können. Auf Seite 30 haben wir es in unserer Tabelle 1 graphisch dargestellt.

Der Gelenkknorpel stellt, ähnlich wie andere Stützgewebe, eine invariante Einheit dar, d.h. er bleibt nicht in der ursprünglich gebildeten Struktur und Zusammensetzung (Knese 1979). Die Umgestaltung der Interzellulärsubstanz durch Aufbau und Abbau wird von den Zellen vermutlich nach einem gewissen Zeitplan durchgeführt. Chemische, biologische, enzymologische Veränderungen der Grundsubstanz können umgekehrt die Zellfunktionen beeinflussen. Bei pathologischen Vorgängen wird der normale Chemismus der Grundsubstanz mit kontinuierlichem Elektrolytaustausch gestört, weil durch die Entmischungsprozesse vermehrt saure Mucopolysaccharide freigesetzt werden (Rössler 1961).

Der Gelenkknorpel hat obwohl bradytrophes Gewebe einen regen, aktiven Stoffwechsel, obgleich er keine gewebeeigene, aktive Leistung zeigt, wie z.B. Herzmuskel oder Leberparenchym. In seinem Stoffwechselgeschehen spielt die anaerobe Glykolyse eine Rolle. Das Knorpelgewebe ist nicht in der Lage, die volle glykolytische Reaktion zu katalysieren, sondern es werden nur Triosen verwertet, da die Enzyme für den Hexosenabbau fehlen.

Nach Knese (1979) liegen nur wenige Angaben über Enzymausstattung des hyalinen Epiphysen-Knorpels vor, da der histochemische Enzymnachweis im Skelettgewebe sehr schwierig ist. Er berichtet daher vom "ruhenden" Knorpel, aber erwähnt jedoch, daß im wachsenden Epiphysenknorpel eine zunehmende Glykogenspeicherung und eine MPS-Produktion mit Vermehrung der Interzellulärsubstanzen erfolgt und auf Grund des unterschiedlichen Verteilungsmusters der Kohlenhydrate in den Chondrozyten das Glykogen ein Charakteristikum der Knorpelzellen ist und in ihrem Stoffwechsel eine große Rolle spielt.

Besonderes Augenmerk wurde der hypertrophen Knorpelzelle gewidmet. U.a. Sundberg (1924), Zelandier (1959) berichten über sie als degenerierende und absterbende Zellen. Bargmann (1977) bezeichnet sie dagegen als Zellen mit erhöhter Aktivität. Eine der Ansatzpunkte zur Untersuchung der Aktivität der hypertrophen Chondrozyten geben z.B. das in ihnen gespeicherte Glykogen und Prozesse, denen Glykogen bzw. Glucose als Substrat dienen.

In unserem Laufversuch konnten wir eine kontinuierliche Glykogenabnahme in den Zellen beobachten. Analog anderer Gewebe, die Glykogen speichern, wird also auch im Knorpelgewebe dieser Energiespeicher mobilisiert, auch wenn dieser Prozeß langsamer als im Muskel oder der Leber abläuft. Ein Lauftraining stellt für Meerschweinchen, die keine Läufer sind, physiologisch vergleichbare Bedingungen dar, wie z.B. ein längeres Hungern und der Organismus reagiert damit auf die veränderte Stoffwechselsituation.

Bei der PAS-, Alcianblue-PAS- und Toluidinblau-Metachromasie stellten wir eine zunehmende Reaktion von der Knorpeloberfläche Richtung Knorpelknochengrenze fest. Die Interzellulärsubstanz der hypertrophen Region unterscheidet sich in ihrer Zusammensetzung und färbereaktion von jeder der anderen Regionen. Dieser Unterschied beruht nach Campo und Dziewiatkowski (1963) auf einem veränderten Synthesemuster der Zellen und auf einem Abbau von Polysacchariden. Im Gegensatz zu o.g. Autoren und zu unserem Versuch schreibt Brachet (1893), daß die Interzellulärsubstanz in der hypertrophen Region ihre Färbbarkeit verliert. Nach Sylven (1947a) fehlt dem mineralisierten Knorpel eine Metachromasie. Nach der Laufbelastung konnten wir eine Anfärbbarkeitsabnahme der PAS- und Alcianblue-PAS-Reaktion der Interzellulärsubstanz feststellen, während die Metachromasie zwar auch schwächer ausgeprägt ist, dafür aber sich auf die ganze Knorpeldicke ausbreitet. Auch die PAS-positiven Granula in den Chondrozyten scheinen nach dem Lauftraining zuzunehmen. Außerdem glauben wir eine Knorpelverdickung in den tieferen Knorpelzonen auf Kosten der oberen Schichten beobachtet zu haben. Wir erklären uns dies mit einer erhöhten Stoffwechselaktivität der Zellen in der radiären und Verkalkungszone und dadurch mit einem Auseinanderweichen der Knorpelzellen in dieser Region.

Es ist jedoch fraglich, ob uns unsere Ergebnisse zu bestimmten Aussagen über die stoffliche Zusammensetzung bzw. Zustand der Zellen und Interzellulärsubstanzen berechtigen. Auch wenn regionale Färbungsdifferenzen der Interzellulärsubstanz des hyalinen Gelenkknorpels zu einer Interpretation herausfordern, ist die Beurteilung auf Kohlenhydrate und MPS ungewöhnlich schwierig.

5. Zusammenfassung

Meerschweinchen wurden auf einem Laufband über unterschiedliche Wegstrecken belastet, die Kniegelenke entnommen und der hyaline Gelenkknorpel histologisch aufgearbeitet. Er stellt ein Multikomponentensystem dar, das aus Fibrillen, Mucopolysacchariden und Zellen besteht. Er besitzt einen Stoffwechsel, der empfindlich auf Belastungen reagiert.

Die in der Literatur mitgeteilten Befunde über Struktur, Bildung und Zusammensetzung der Interzellulärsubstanz, speziell der Mucopolysaccharide, wurden zum Vergleich herangezogen. Mit der Carminfärbung nach Best zum Glykogennachweis in den Chondrozyten, sowie mit PAS-, Alcianblue-PAS-Reaktion und Toluidinblau-metachromasie wurde das unterschiedliche färberische Verhalten der Knorpelzellen und der Grundsubstanz in den verschiedenen Knorpelregionen nach Belastung gezeigt und mit Kontrolltieren verglichen. Der Glykogenverlust und das veränderte färberische Verhalten der Matrix sind Ausdruck für die Stoffwechselbeeinflussung und -steigerung der Chondrozyten nach dynamischer Belastung.

6. Literaturverzeichnis

AKAMINE, R.N., ENGEL, M.B., SARNAT, B.:

Histochemical studies of cartilage implants.

J. Bone Jt. Surg. 36-A, 1166-1174, 1954

ANDERSON, D.R.:

The ultrastructure of elastic and hyaline cartilage
of the rat.

Amer. J. Anat. 114, 403-433, 1964

ARENT, W.:

Histochemische und elektronenoptische Untersuchungen
der Grundsubstanzen an der Oberfläche menschlicher
Gelenkknorpel.

Beitr. Orthop., 17, 43-46, 1970

ARNOLD, J.:

Supravitale Färbung mitochondrienähnlicher Granula in den
Knorpelzellen nebst Bemerkungen über die Morphologie des
Knorpelglykogens.

Anat. Anz. 32, 361-366, 1908

BARGMANN, W.:

Histologie und mikroskopische Anatomie des Menschen.

7. Aufl. Stuttgart, G. Thieme Verlag, 1977

BELL, E.T.:

On the histogenesis of the adipose tissue of the ox.

Amer. J. Anat., 9, 401-438, 1909

BENNINGHOFF, A.:

Experimentelle Untersuchungen über den Einfluß verschieden-
artiger mechanischer Beanspruchung auf den Knorpel.

Verh. anat. Ges. (Jena), 33, Vers.

Erg.-H. Anat. Anz. 59, 194-215, 1924

BENTLEY, J.P., ROKOSOVA, B.:

Metabolic heterogeneity of rabbit ear cartilage chondroitin sulfate.

Chemistry and molecular biology of the intercellular matrix
(ed. by E.A. Balazs)

Vol. 2, p. 935-941. New York, London: Academic Press 1970

BERNARD, C.:

Leçons de physiologie expérimentale appliquée à la
Médecine (Baillière, Paris, 1854)

BERNARD, C.:

De la matière glycogène considérée comme condition de
développement de certains tissus, chez le fœtus, avant
l'apparition de la fonction glycogénique du foie.

C.R. Acad. Sci. 48, 673-684, 1859

BONA, C., PITIS, M., STANESCU, V., IONESCU, V.:

Histochemical and enzymologic studies on the growth cartilage.

Acta Hictsochem. (Jena), 18, 295-316, 1964

BONA, C., STANESCU, V., DUMITRESCU, M., GHYKA, G., IONESCU, V.:

Histochemical studies on the growing human tibial cartilage.

Acta Histochem. (Jena), 21, 98-119, 1965a

BRACHET, A.:

Etude sur la résorption du cartilage et le développement des
os longs chez les oiseaux.

Mth. int. J. anat. Physiol. 10, 391-417, 1893

BUDDECKE, E.:

Grundriss der Biochemie. Glykosaminoglykane.

Walter de Gruyter, Berlin, New York, 186-191, 1973

CAMPO, R.D., DZIEWIATKOWSKI, D.D.:

Turnover of the organic matrix of cartilage and bone as visualised by autoradiography.

J. Cell. Biol. 18, 19-29, 1963

CAMPO, R.D., TOURTELOTTE, C.D.:

The composition of bovine cartilage and bone.

Biochim. biophys. Acta (Amst.) 141, 614-624, 1967

CANEPA, G.:

Istologia ed istochimica delle cartilagini corticali in rapporto al problema dell'identificazione dell'età

Med. leg. 4, 167-205, 1956a

CARLSON, H.:

Reactions of rabbit patellary cartilage following operative defects.

Acta. Orthop. Scand. 28, 1-104, 1957

COLLINS, D.H., Mac ELLIGOTT, T.F.:

Sulphate (35 S04) uptake by chondrocytes in relation to histological changes in osteo-arthritic human articular cartilage.

Ann. Rheum. Dis. 19, 318, 330, 1960

COLLINS, D.H., GHADIALLY, F.N., MEACHIM, G.:

Intra-cellular lipids of cartilage.

Ann. Rheum. Dis. 24, 123-135, 1965

COUTEAUX-BARGETON, M.:

Mode de répartition de glycogène dans le cytoplasme de divers types cellulaires.

C.R. Soc. Biol. (Paris) 144, 880-882, 1950

DIETEL, W.:

Gewichts- und Stoffwechseluntersuchungen an Albinoratten unter Trainingsbedingungen und Stressbedingungen.

48 S; Frankfurt (Main) Univ. Fachbereich 19 - Humanmedizin, Diss. 1976

DURNING, W.C.:

Submicroscopic structure of frozendried epiphyseal plate and adjacent spongiosa of the rat.

J. Ultrastruct. Res. 2, 245-260, 1958

DUSTMANN, H.O., PUHL, W., SCHULITZ, K.P.:

Knorpelveränderungen beim Hämarthrom unter besonderer Berücksichtigung der Ruhigstellung.

Arch. orthop. Unfall-Chir. 71, 148-159, 1971

EEG-LARSEN, N.:

An experimental study on growth and glycolysis in the epiphyseal cartilage of rats.

Acta physiol. scand. 38, Supp. 128, 1-77, 1956

EICHELBERGER, L.E., BROWER, T.D., ROMA, M.:

Histochemical characterization of inorganic constituents, connective tissue and the chondroitin sulfate of extracellular and intracellular compartments of hyaline cartilages.

Amer. J. Physiol. 166, 328, 1951

EVANS, F.B., EGGERS, G.W.N., BUTLER, J.K., BLUMEL, J.:

Experimental immobilisation and remobilisation of rat knee joints.

J. Bone Jt. Surg. 42-A, 737-758, 1960

FAWNS, H.T., LANDELLS, J.W.:

Histochemical studies of rheumatic conditions. I. Observations on the fine structures of the matrix of normal bone and cartilage.

Ann. Rheum. Dis. 12, 105, 1953

FINLAY, J.B.:

Impact characteristics of articular cartilage.

Biomed. Sci. Instrum. 13, 47-50, 1977

FISCHEL, A.:

Untersuchungen über vitale Färbung.

Anat. H. 52/53, 417-530, 1901

- FÖLDES, I., NAGY, I., ZS., BENKÖ, K., LEVAI, G., ARY-BALOGH, P.:
Elektronenmikroskopische Untersuchungen am postembryonalen
Epiphyseknorpel der Albinoratte.
Acta. morph. neerl.-scand. 13, 283-299, 1963
- FÖLDES, I., MODIS, L., SÜVEGES, I.:
Investigation of the mucopolysaccharides in the proximal
epiphyseal cartilage of the rat: a comparison of the methods
of histochemical assay.
Acta Morph. Acad. Sci. Hung. 13, 141-153, 1965
- FOLLIES, R.H., Jr.:
Cartilage and Bone matrix: Chemical structure, formation
and destruction.
Tr. Conf. Metab. Interrelat. 4, 11-31, 1952a
- GAGE, S.H.:
Permanent preparations of tissues and organs to show glycogen.
Trans amer. micr. Soc. 28, 203-205, 1906
- GEDÉON, P., MAZIÈRES, B., FICAT, P.:
Un nouveau modèle d'arthrose expérimentale: La contusion du
cartilage.
Revue du rhumatisme 45 (6), 401-408, 1978
- GENDRE, H.:
Le glycogene dans les cartilages en voie d'ossification.
Bull. Histol. appl. 15, 165-178, 1938
- GIERKE, A.:
Das Glykogen in der Morphologie des Zellstoffwechsels.
Beitr. path. Anat. 37, 502-567, 1905
- GLEGG, R.E., CLERMONT, Y., LEBLOND, C.P.:
The use of lead tetraacetate, benzidine, o-dianisidine and a
"Film Test" in investigating the periodic acid Schiff technic.
Stain Technol. 27, 277-305, 1952

GRAUMANN, W.:

Das Vorkommen von Perjodsäure-Leukofuchsin (PSL)-positiven Substanzen im embryonalen Organismus.

Anat. Anz. 99, 19-20, 1952a

GRAUMANN, W.:

Die histochemische Reaktion der Knorpelsubstanz mit Perjodsäure und Bleitetraacetat.

Mikroskopie 8, 218-240, 1953b

GRAUMANN, W.:

Glykogen im embryonalen Kopfbindegewebe.

Verh. anat. Ges. 51, 219-227, 1953c

GRAUMANN, W.:

Polysaccharide, Ergebnisse der polysaccharidhistochemie: Mensch und Säugetiere. Handbuch der Histochemie.

Bd. II., Teil II, Stuttgart, Gustav Fischer Verlag 1964

GRITZKA, T.L., FRY, L.R., CHEESMAN, R.L., La VIGNET, A.:

Verschlechterung am Gelenkknorpel durch kontinuierliche Kompression am Gelenk beim lebenden Kaninchen.

J. BONE Jt. Surg. Boston 55, 1698-1720, 1973

HADHÁZY, C., GLANT, T., MÁNDI, B., HARMATI, S., BORDÁN, L.,
BALOGH, K.:

Studies on cartilage formation. XX Histochemical investigation of some enzymes of glycogen metabolism in regenerative articular surfaces.

Acta Morphol. Acad. Sci. Hung. 23 (3), 183-193, 1975

HALLEN, A.:

Hexosamine and estersulphate content of the human nucleus pulposus at different ages.

Acta. chem. scand. 12, 1869-1872, 1958

HARRIS, H.A.:

Glycogen in bone cartilage.
Nature (Lond.) 130, 996-997, 1932

HERBAI, LINDAHL:

Regional differences in the incorporation rates of ^3H -acetate and ^{35}S -sulfate into chondroitin sulfate of mouse costal cartilage in vitro.
Acta physiol. scand. 80, 502-509, 1970

HIRSCHMANN, A., McCABE, D.M.:

Staining of intracellular granules in fresh epiphyseal cartilage by cationic dyes.
Calcif. Tiss. Res. 4, 260-268, 1969

HOFFMANN, P., MEYER, K.:

Structural studies of mucopolysaccharides of connective tissues.
Fed. Proc. 21, 1064-1069, 1962

HOLMGREN, Hj.:

Über Vorkommen und Bedeutung der chromotropen (metachromatischen) Substanz in menschlichen Feten.
Anat. Anz. 88, 246-251, 1939

HOOFF, A. van den:

Polysaccharide histochemistry of enchondral ossification.
Acta Anat. (Basel) 57, 16-28, 1964

HOOGHWINKEL, H.J., SMITH, M.:

The specificity of the periodic acid-Schiff technique studied by a quantitative test-tube method.
J. Histochem. Cytochem. 5, 120-126, 1957

JOEL, W., MASTERS, Y.F., SHETLAR, M.R.:

Comparison of histochemical and biochemical methods for the polysaccharides of cartilage.
J. Histochem. Cytochem. 4, 476-478, 1956

KAPLAN, D., MEYER, K.:

Ageing of human cartilage.

Nature (Lond.) 183, 1267-1268, 1959

KAWIAK, J.:

Presence of chondroitin sulphate in chondrocytes.

I. Histochemical and autoradiographic observations.

Acta histochem. (Jena) 15, 153-160, 1963a

KELLEWALD, D.:

Funktionsentwicklung des hyalinen Knorpels: histochemische und elektronenoptische Untersuchung beim Goldhamster.

Tübingen, Univ. Fachbereich Theoret. Medizin, Diss. 1972

KNESE, K.H.:

Handbuch der mikroskopischen Anatomie des Menschen.

II/5. Stützgewebe und Skelettsystem; 2. Band Gewebe.

Springer Verlag Berlin, Heidelberg, New York, 1979

KNESE, K.H., KNOOP, A.M.:

Über den Ort der Bildung des Mucopolysaccharid-Protein-Komplexes im Knorpelgewebe.

Z. Zellforsch. 53, 201-258, 1961a

KOBAYASHI, S.:

Calcification in fish and shell-fish. II. A paper electrophoretic study on the acid mucopolysaccharides and PAS-positive materials of the extrapallial fluid in some molluscan species.

Bull. Jap. Soc. Fish 30, 893-899, 1964

KOSTENSZKY, K.S., OLAH, E.H.:

Effect of increased functional demand on the glucosaminoglycan (mucopolysaccharide) content of the articular cartilage.

Acta Biol. Acad. Sci. Hung. 23, 75-82, 1972

KRAKOVITS, G.:

Structure of articular cartilage.

Morphol. Igazságügyi Orv. Sz. 11, 189-194, 1972

KONTSCHER, G.:

Über den Einfluß der Ruhigstellung auf die Gelenkfunktion.
Zbl. Chir. 75, 1203-1210, 1957

KUHN, R., LEPPELMANN, H.J.:

Galaktosamin und Glucosamin im Knorpel in Abhängigkeit vom Lebensalter.

Justus Liebigs Ann. chem. 611, 254-258, 1958

LASH, J.W., WHITEHOUSE, M.W.:

An unusual polysaccharide in the chondroid tissue of the snail
Busycon: polyglucose sulfate.

Biochem. J. 74, 351-355, 1960

LEBLOND, C.P., GLEGG, R.E., EIDINGER, D.:

Presence of carbohydrates with free 1,2-glycol groups in sites stained by the periodic acid-Schiff technique.

J. Histochem. Cytochem. 5, 445-458, 1957

LEMPERG, R.K., LARSSON, S.E., HJERTQUIST, S.O.:

The Glycosaminoglycans of bovine articular cartilage.

I. Concentration and distribution in different layers in relation to age.

Calcif. Tissue Res. 15 (3), 237-251, 1974

LEPPELMANN, H.:

The mucopolysaccharide content of cartilage in dependence on age.

Z. Rheumaforsch. 18, 348-354, 1959

LEVAI, G., MARX, I.:

Untersuchungen über Knorpelgewebe.

Zeitschr. f. mikro.-anat. Forschung 80, 177-190, 1968

LILLIE, R.D.:

Further exploration of the HJO_4 Schiff reaction with remarks on its significance.

Anat. Rec. 108, 239-253, 1950

LISON, L.:

Sur la spécificité du réactif de Schiff envers les aldéhydes.
Bull. Histol. Techn. micr. 9, 177-195, 1932

LISON, L.:

Etudes sur la metacromasie; colorants métachromatiques et
substances chromotropes.
Arch. Biol. 46, 599-668, 1935

LOEVEN, W.A.:

The binding collagen-mucopolysaccharide in connective tissue.
Acta. anat. (Basel) 24, 217-224, 1955

LOEWI, G.:

Changes in the ground substance of ageing cartilage.
J. Path. Bact. 65, 381-388, 1953

LOTHE, K., RÜTTNER, J.R.:

Histochemical localization of acid glycosaminoglycans in
human articular cartilage.
Path. Microbiol. 37, 227-240, 1971

LUBARSCH, O.:

Über die Bedeutung der pathologischen Glykogenablagerungen.
Virchows Arch. path. Anat. 183, 188-228, 1906

McELLIGOTT, T.F., POTTER, J.L.:

Increased fixation of sulfur-35 by cartilage in vitro following
depletion of the matrix by intravenous papain.
J. exp. Med. 112, 743-750, 1960

McLEOD, W.D., MOSCHI, A., ANDREWS, J.R., HUGHSTON, J.C.:

Tibial plateau topography.
Am. J. Sports Med. 5 (1), 13-18, 1977

MAIBACH, E.:

Histochemical examination of articular cartilage in various ages.
Z Rheumaforsch. 23, 184-198, 1963

MANCINI, R.E.:

Histochemical study of glycogen in tissues.

Anat. Rec. 101, 149-159, 1948

MANKIN, H.J.:

The structure, chemistry and metabolism of articular cartilage.

Bull. Rheum. Dis. 17, 447-452, 1967

MAROUDAS, A.:

Physical chemistry and the structure of cartilage.

J. Physiol. (Lond.) 223, 21-23, 1972

MATTHIAS, H.H., GLUPE, J.:

Immobilisation und Druckbelastung in ihrer Wirkung auf die Gelenke.

Arch. orthop. Unfallchir. 60, 380, 1966

MIYAZAHI, T.:

Biochemical studies on carbohydrates. V.A. micro method for quantitative estimation of chondroitinsulfuric acid in cartilage.

J. Biochem. (Tokyo) 20, 211-222, 1934a

MONTAGNA, W.:

Glycogen and lipids in human cartilage, with some cytochemical observations on the cartilage of the dog, cat and rabbit.

Anat. Rec. 103, 77-92, 1949

MORRISON, R.I.G.:

The breakdown of proteoglycans by lysosomal enzymes and its specific inhibition by an antiserum to cathepsin D.

In: Chemistry and molecular biology of the intercellular matrix. (ed. by E.A. Balazs) Vol. 3, 1683-1706, Academic Press, 1970

MÖLLER, G.:

Die Darstellung saurer Mucopolysaccharide durch die Toluidinblau-metachromasie, die PAS-Reaktion und die Ferrihydroxydsol-PAS-Reaktion.

Acta histochem. 6, 218-224, 1959

MUSILOVÁ, J., MUSIL, J.:

Protein-polysaccharides in normal and degenerated articular cartilage.

Res. Ins. Rheum. Dis. 19, 3-11, 1973

NEUMANN, E.:

Bemerkungen über das Knorpelgewebe und den Ossifikationsprozeß.

Arch. Heilk. 11, 414-424, 1870

NOWIKOFF, M.:

Beobachtungen über die Vermehrung der Knorpelzellen nebst einigen Bemerkungen über die Struktur der "hyalinen" Knorpelgrundsubstanz.

Z. Zool. 90, 205-257, 1908

OGDEN, J.A.:

The anatomy and function of the proximal tibiofibular joint.

Clin. Orthop. 101, 186-191, 1974

OPITZ, M., DORSCH, H.H.v.:

Glykogennachweis mit Alizarinblau.

Acta histochem. 45, 219-223, 1973

OTTE, P.:

Über das Wachstum der Gelenkknorpel.

In: Theoretische und klinische Medizin in Einzeldarstellungen.

(Hrsg. H. Schäfer) Bd. 23, 7-107, Hüthig Verlag, 1965

PALLADINI, G., LAURO, G.:

Observations sur la significativite de la coloration aux

Alcians pour les mucopolysaccharides.

Histochemie 16, 15-22, 1968

PEARSE, A.G.E.:

Histochemistry. Theoretical and applied.

Vol. 1 3rd Edition, J. and A. Churchill Ltd. London, 1968

PEYRON, J.G.:

Articular cartilage. 1. Physiology in the adult.
Nouv. Press. Med. 2, 1667-1670, 1973

PRETO PARVIS, V., PIRIA, F.:

Contribution à l'étude histochimique et électrophorétique
des mucopolysaccharides des tissue conjouctifs.
C.R. Assoc. Anat. 43, 680-686, 1956

PRITCHARD, J.J.:

A cytological and histochemical study of bone and cartilage
formation in the rat.
J. Anat. (Lond.) 86, 259-277, 1952

PUHL, W., DUSTMANN, H.O., QUOSDORF, U.:

Tierexperimentelle Untersuchungen zur Regeneration des Gelenk-
knorpels.
Arch. orthop. Unfall-Chir. 74, 352-265, 1973

PUHL, W., DURSTMANN, H.O.:

Die Reaktionen des Gelenkknorpels auf Verletzungen (Tier-
experimentelle Untersuchungen).
Z. Orthop. III, Enke Verlag Stuttgart, 494-497, 1978

RICHTER, J.E.:

Gelenkknorpel-Veränderungen bei Ratten nach längerer Einwirkung
von Erschütterungen.
Wehrmed. Mschr. 21, 161-168, 1977

RIZZOLI, C., MASTROBUONO, M.:

Osservazioni istochimiche sulla cartilagine jalina.
Bollet. Soc. ital. Biol. sper. 29, 1418-1421, 1953

RÜSSLER, H.:

Untersuchungen über die Struktur der Gelenkknorpel als Voraus-
setzung für seine funktionelle Leistungsfähigkeit.
Z. Orthop. 94, 595-608, 1961

ROHR, H., WALTER, S.:

Die Mucopolysaccharidsysteme in ihrer Beziehung zur sub-
mikroskopischen Struktur der Knorpelzelle.

Acta. Anat. 64, 223-234, 1966

ROMEIS, B.:

Mikroskopische Technik.

München: Leibnitz Verlag, 15. Aufl., 1948

ROUGET, C.:

Des substances amyloides; de leur role dans la constitution
des tissus des animaux.

J. de Physiologie, de l'home et des animaux, 2, 308-325, 1859

RÜTTNER, J.R., SPYCHER, A.M., WERNER, G., AMADO, R.:

Biochemische und morphologische Befunde am Knorpel des
Femurkopfes.

Verh. Dtsch. Ges. Pathol. 58, 392-394, 1974

SALTER, R.B., FIELD, P.:

The effects of continuous compression on living articular
cartilage. An experimental investigation.

J. Bone Jt. Surg. 42-A, 31-49, 1960

SCHAFFER, J.:

Über den feineren Bau und die Entwicklung des Knorpelgewebes
und über verwandte Formen der Stützsubstanz.

2. Teil, Z. Zool. 80, 155-258, 1905

SCHAFFER, J.:

Die Stützgewebe.

In: Handbuch der mikroskopischen Anatomie des Menschen
(Hrsg. V. von Möllendorff).

Bd. 2, Teil 2, 1-390, Berlin, Julius Springer, 1930

SCHAJOWICZ, F., CABRINI, R.L.:

The effect of acids (decalcifying solutions) and enzymes on the histochemical behavior of bone and cartilage.

J. Histochem. Cytochem. 3, 122-129, 1955

SEO, S.:

Change in the reaction of tissues to periodic acid Schiff's stain during the development of the white rat.

Kyushu Mem. med. Sci. 5, 169-183, 1955

SHAW, N.E., MARTIN, B.F.:

Histological and histochemical studies on mammalian knee joint tissues.

J. Anat. 96, 359-374, 1962

SHETLAR, M.R., MASTERS, Y.F.:

Effect of age on polysaccharide composition of cartilage.

Proc. Soc. Exp. biol. (N.Y.) 90, 31-33, 1955

STOCKWELL, R.A.:

The lipid and glycogen content of rabbit articular hyaline and non-articular hyaline cartilage.

J. Anat. 102, 87-94, 1967

STOCKWELL, R.A., SCOTT, J.E.:

Observations on the acid glycosaminoglycan (mucopolysaccharide) content of the matrix of ageing cartilage.

Ann. rheum. Dis. 24, 341-350, 1965

SUNDBERG, C.:

Glykogen in menschlichen Embryonen von 15, 27 und 40 mm.

Z. Anat. Entwickl.-Gesch. 73, 168-246, 1924

SVEJCAR, J.:

Mucopolysaccharides.

Cas. lek. cesk. 107, 1345-1352, 1968

SYLVEN, B.:

Cartilage of chondroitin sulphate. II. Chondroitin sulphate and the physiological ossification of cartilage.

J. Bone Jt. Surg. 29, 745-752, 1974a

SZIRMAI, J.A., BALAZIS, E.A.:

Metachromasia and the quantitative determination of dyebinding.

Acta histochem. (Jena), Suppl. 1, 56-79, 1958

THAXTER, T.H., MANN, R.A., ANDERSSON, C.E.:

Degeneration of immobilized knee joints in rats.

J. Bone Jt. Surg. 47-A, 3, 1965

TRIAS, A.:

Effects of persistent pressure on the articular cartilage.

J. Bone Jt. Surg. 43-B, 376-386, 1961

TROYER, H.:

The effect of short term immobilisation on the rabbit knee joint cartilage.

Clin. Orthop. 107, 249-257, 1975

VIGNON, E.:

Structure and metabolism of articular cartilage.

Pathol. Biol. (Paris) 19, 771-785, 1971

VINEL, P.:

Articular cartilage.

Rheumatologie 22, 387-397, 1970

WALCHER, K., STÜRZ, H.:

Führt Immobilisation und dosierte Druckbelastung eines Gelenkes im Tierversuch zum knöchernen Durchbau?

Arch. orthop. Unfall-Chir. 71, 216-224, 1971

WATZKA, M.:

Kurzlehrbuch der Histologie und mikroskopischen Anatomie des Menschen.

F.K. Schattauer Verlag Stuttgart, 36-39, 1964

WINTER, W.:

Beiträge zur Kenntnis der quantitativen Zusammensetzung des Knorpelgewebes.

Biochem. Z. 246, 10-28, 1932

WISLOCKI, G.B., BUNTING, H., DEMPSEY, E.W.:

Metachromasia in mammalian tissues and its relationship to mucopolysaccharides.

Amer. J. Anat. 81, 1-37, 1947a

ZBINDEN, G.:

Der hyaline Knorpel im elektronenmikroskopischen Bild.

Z. wiss. Mikr. 61, 231-238, 1953a

ZBINDEN, G.:

Über Feinstruktur und Altersveränderungen des hyalinen Knorpels im elektronenmikroskopischen Schnittpräparat und Beitrag zur Kenntnis der Verfettung der Grundsubstanz.

Schweiz. Z. allg. Path. 16, 165-189, 1953b

ZELANDER, T.:

Ultrastructure of articular cartilage.

Z. Zellforsch. 49, 720-738, 1959

ZUGIBE, F.T., BROWN, K.D., LAST, J.H.:

A new technique for the simultaneous demonstration of lipid and acid polysaccharides on the same tissue section.

J. Histochem. Cytochem. 7, 101-106, 1959

Lebenslauf

Am 29.12.1950 wurde ich in Prag als erster Sohn des Dipl.-Ing. Josef Liedl und seiner Ehefrau Zdenka, geb. Kott geboren.

Nach der Grund- und Volksschule von 1957 bis 1966 folgte das Gymnasium mit Abitur 1969. Im August 1969 sind wir (meine Eltern, mein Bruder und ich) in die BRD übersiedelt.

Nachdem ich in den Goethe-Instituten Rothenburg ob der Tauber und Grafrath bei München (1970-1971) die deutsche Sprache erlernen und in Darmstadt (1971-1972) das Abitur nachholen konnte, begann ich an der Johannes Gutenberg-Universität in Mainz im Wintersemester 1972/1973 Zahnmedizin zu studieren.

Kurz nach meinem Examen im November 1978 heiratete ich am 15. Dezember 1978 meine Frau Linda Liedl, geb. Freidank.

Von April 1979 bis März 1981 war ich in der Zahnstation der Bundeswehr in Mainz als Stabsarzt tätig. Am 13. November 1980 kam unsere Tochter Mirjam zur Welt.

Von April 1981 bis Dezember 1981 war ich als Assistenz-Zahnarzt in einer Praxis in St. Georgen/Schwarzwald beschäftigt.

Am 1.4.1982 werde ich eine Zahnarztpraxis in Kehl/Rhein eröffnen.

D a n k s a g u n g

Herrn Professor Dr. E. Stofft danke ich für die
Überlassung des Themas und für seine intensive
Betreuung und Unterstützung dieser Arbeit.

